

Philipps



**Universität
Marburg**

**Das DegS-DegU Zwei-Komponenten System und dessen Rolle bei der Regulation
des osmotisch induzierbaren *yqiHIK* Operons aus *Bacillus subtilis***

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)**

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stephanie Löbach
aus Kassel

Marburg (Lahn), 2015

Philipps



**Universität
Marburg**

**Das DegS-DegU Zwei-Komponenten System und dessen Rolle bei der Regulation
des osmotisch induzierbaren *yqiHIK* Operons aus *Bacillus subtilis***

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)**

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stephanie Löbach
aus Kassel

Marburg (Lahn), 2015

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2012 bis Dezember 2015 im Laboratorium für Mikrobiologie am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

16.02.2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Thanbichler

Tag der mündlichen Prüfung am: 04.03.2016

Meinen Liebsten

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
I Zusammenfassung	1
II Summary	2
III Einleitung	3
1 <i>Bacillus subtilis</i>	3
1.1 Differenzierungsprozesse in <i>B. subtilis</i>	4
1.1.1 Biofilmbildung.....	5
1.1.2 Sporulation.....	6
1.1.3 Kannibalismus und genetische Kompetenz.....	7
2 Osmoregulation in <i>B. subtilis</i>	9
2.1 Die „Salt out“ Strategie.....	10
3 Zwei-Komponenten Systeme	13
3.1 Aufbau eines TCS.....	13
3.1.1 Die Histidinkinase	13
3.1.2 Der Antwortregulator.....	14
3.2 Das DegS-DegU Zwei-Komponenten System aus <i>B. subtilis</i>	15
3.2.1 Aufbau und Mechanismus des DegS-DegU TCS.....	15
3.2.2 Regulation des DegS-DegU TCS	15
3.2.3 Prozesse, die durch den Antwortregulator DegU reguliert werden	18
4 Die bakterielle Zellwand	20
4.1 Allgemeiner Aufbau der bakteriellen Zellwand	20
4.2 Synthese und Recycling der Zellwand.....	21
4.2.1 Zellwand Recycling in <i>B. subtilis</i>	22
4.3 Autolysine.....	23
4.3.1 Das <i>yqiHIK</i> Operon	25
5 Ziel dieser Arbeit	27
IV Ergebnisse	28
1 Regulatorische und physiologische Analyse des DegS-DegU Zwei-Komponenten Systems	28
1.1 Das <i>degSU</i> Operon ist osmotisch induzierbar	28
1.1.1 Reportergenanalyse der Promotoren von <i>degS</i> und <i>degU</i>	29
1.1.2 Eine graduelle Erhöhung des osmotischen Stresses steigert die Expression von <i>degS</i> und <i>degU_{P3}</i>	31
1.1.3 Zucker erhöhen die osmotische Induktion des DegS-DegU TCS	33
1.2 Das <i>rapG-phrG</i> Operon ist osmotisch induzierbar.....	34
1.2.1 Reportergenanalyse der Promotoren von <i>rapG</i> und <i>phrG</i>	34
1.3 Der Einfluss des DegS-DegU TCS auf das Wachstum von <i>B. subtilis</i> unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen.....	36
1.4 Wechselwirkungen des DegS-DegU TCS mit kompatiblen Soluten.....	38
1.4.1 Glycin-Betain protektiert die Mutanten des DegS-DegU TCS.....	38

1.4.2	DegU~P rettet nicht den Wachstumsdefekt der <i>proHJ</i> Deletionsmutante	39
1.4.3	Der Einfluss des DegS-DegU TCS auf die Akkumulation von Prolin	40
2	Analyse des DegU~P Regulons und dessen Salzabhängigkeit.....	41
2.1	Bioinformatischer Vergleich des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons aus <i>B. subtilis</i>	42
2.2	Transkriptionelle Analyse potentiell salzinduzierbarer und DegU~P abhängiger Gene	45
2.2.1	Die Salzinduktion der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons ist nicht abhängig von dem DegS-DegU TCS	45
2.2.2	Die Abhängigkeit verschiedener Gene von DegU~P unter isoosmotischen Bedingungen.....	48
2.2.3	Die Abhängigkeit verschiedener Gene von DegU~P unter hyperosmotischen Bedingungen.....	50
2.3	Detaillierte Analyse des ESAT-ähnlichen Sekretionssystem.....	53
2.3.1	Die Deletion des T7SS hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von <i>B. subtilis</i> unter hochosmolaren Bedingungen.....	54
2.3.2	Das T7SS ist salzinduzierbar und abhängig von DegU~P	55
2.3.3	Die Expression des T7SS in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen	56
2.3.4	Das T7SS wird durch osmotischen Stress induziert.....	57
2.3.5	Der Einfluss von Biofilmregulatoren auf die Expression des T7SS	58
3	Analyse des <i>yqiHIK</i> Operons in Abhängigkeit des DegS-DegU TCS	60
3.1	Das <i>yqiHIK</i> Operon ist salzinduzierbar und abhängig von DegU~P	60
3.1.1	Erhöhte Konzentrationen an DegU~P führen zu einer linearen Salzabhängigkeit	63
3.2	Die stromaufwärts gelegene AT-reiche Region ist wichtig für die Expression von <i>yqiHIK</i>	63
3.3	Identifizierung der DegU~P Bindestelle	65
3.4	Ein großer Abstand zwischen der DegU~P Bindestelle und dem SigA – abhängigen Promotor ist nötig für die <i>yqiHIK</i> Expression	68
3.5	Zielgerichtete Mutagenese des SigA-abhängigen Promotors des <i>yqiHIK</i> Operons	70
3.6	Der Einfluss einer membrangebundenen Sensorkinase DegS auf die Expression des <i>yqiHIK</i> Genclusters	73
3.7	Die Deletion von RapG-PhrG zeigt keinen Einfluss auf die Expression von <i>yqiHIK</i>	75
3.8	Lokalisation der Proteine YqiH, Yqil und YqiK.....	76
V	Diskussion und Ausblick	78
1	Analyse des DegS-DegU TCS	78
1.1	Osmotische Induktion des DegS-DegU TCS	79
1.2	Der Einfluss des DegS-DegU TCS auf das Wachstum von <i>B. subtilis</i>	80
1.2.1	Der Einfluss von DegU~P auf das Wachstumsverhalten von <i>B. subtilis</i>	81
1.3	Der Einfluss von Salzstress auf das DegU~P Regulon	83
1.4	Der Einfluss des DegS-DegU TCS auf das Typ VII Sekretionssystem	86
2	Erweiterung des DegU~P Regulons	90
3	Analyse der DegS-DegU abhängigen Expression des <i>yqiHIK</i> Operons	91
3.1	Regulation von <i>yqiHIK</i> durch das DegS-DegU TCS auf transkriptioneller Ebene	93
3.1.1	Bindung von DegU~P an den <i>yqiHIK</i> Promotorbereich.....	95
4	Die physiologische Rolle der YqiH, Yqil und YqiK Proteine	98
5	Wahrnehmung eines Umweltreizes in <i>B. subtilis</i>.....	101
5.1	DegS ist nicht der global-agierende Osmosensor in <i>B. subtilis</i>	101
5.2	Welches Signal nimmt DegS wahr?	104
5.3	Wie kann <i>B. subtilis</i> den Salzstress wahrnehmen?	106
VI	Material und Methoden.....	108

1	Chemikalien und Materialien	108
1.1	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	108
1.2	Bakterienstämme	108
1.3	Plasmide	113
1.4	Oligonukleotide	114
2	Medien und Wachstumsbedingungen.....	117
2.1	diverse Medien.....	117
2.2	Medienzusätze und Antibiotika	118
2.3	Sterilisation.....	118
2.4	Wachstumsbedingungen und Vermehrung von Bakterien	118
2.5	Bestimmung der Osmolarität	119
2.6	Ermittlung der Zelldichte	119
2.7	Transformation von <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i>	119
2.7.1	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von <i>B. subtilis</i>	119
2.7.2	Präparation kompetenter Zellen und Transformation von <i>E. coli</i>	120
3	Molekularbiologische Methoden	121
3.1	DNA Techniken	121
3.1.1	Isolierung von genomischer DNA	121
3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	121
3.1.3	Bestimmung der Konzentration von DNA.....	121
3.1.4	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	122
3.1.5	Agarose-Gel-Elektrophorese	122
3.1.6	Restriktionsverdau und Ligation	122
3.1.7	Reinigung von DNA	123
3.1.8	Konstruktion einer Deletion-Insertions-Mutante	123
3.1.9	Zielgerichtete Mutagenese	124
3.1.10	DNA-Sequenzierung	127
3.2	RNA Techniken	127
3.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>B. subtilis</i>	127
3.2.2	Synthese von Digoxigenin- markierten RNA Sonden.....	128
3.2.3	Northern Blot Analyse	129
4	Konstruktion von Bakterienstämmen und Plasmiden	130
4.1	Konstruktion von Plasmiden	130
4.1.1	Optimierung des Reportergen-Plasmids pJMB1	130
4.1.2	Das Plasmid pGP1331	132
4.2	Konstruktion von Bakterienstämmen	133
4.2.1	Konstruktion von Deletion-Insertions-Mutanten.....	133
4.2.2	Konstruktion diverser Reportergen-Fusionsstämmen.....	134
4.2.3	Konstruktion von <i>degU32(Hy)</i> und <i>degS200(Hy)</i> Stämmen.....	134
5	Biochemische Methoden.....	134
5.1	Bestimmung der TreA-Aktivität	134
5.2	Amylase Test	135
5.3	Exoprotease Assay	135
5.4	Bestimmung des Prolin-Pools.....	136
5.5	Ermittlung der Proteinkonzentration.....	136
5.6	Produktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen	137
5.6.1	Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i>	137
5.6.2	Reinigung der Proteine DegS und DegU via Strep-Tag Affinitätschromatographie.....	137

5.6.3 Gel Filtration Analyse.....	138
5.7 SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen.....	138
5.8 Fraktionierung von <i>B. subtilis</i>	139
5.9 Western Blot Analyse.....	139
VII Literaturverzeichnis.....	141
VIII Anhang.....	156
1 Northern Blot Analyse des <i>degSU</i> Operons.....	156
2 Northern Blot Analyse des <i>rapG-phrG</i> Operons.....	157
3 Wachstumsanalyse des DegS-DegU TCS in <i>B. subtilis</i>	159
4 Einfluss des DegS-DegU TCS auf die Prolinkonzentration	159
5 Reporteranalyse der Gene aus dem Überlapp des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons	160
6 Einfluss des alternativen Transkriptionsfaktors σ^B auf die Expression des T7SS	164
7 Die Verlängerung der <i>yqiH-treA</i> Reporterfusion.....	164
8 Gel-Filtrationsanalyse des gereinigten DegU Proteins	165
9 Vorexperimente zu den geplanten Microarray Analysen	166
IX Danksagung.....	169
X Erklärung.....	170
XI Lebenslauf	171

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Differenzierungsprozesse in <i>B. subtilis</i>	4
Abb. 2: Regulation der Biofilmbildung in <i>B. subtilis</i>	6
Abb. 3: Der Ablauf der Sporulation in <i>B. subtilis</i>	7
Abb. 4: Osmoregulation in <i>B. subtilis</i>	12
Abb. 5: Schematische Darstellung eines TCS	13
Abb. 6: Transkriptionelle und posttranslationale Regulation des DegS-DegU TCS	17
Abb. 7: Verschiedene Konzentrationen von DegU~P regulieren diverse Prozesse in <i>B. subtilis</i>	18
Abb. 8: Übersicht über den möglichen Recyclingweg von Muropeptiden in <i>B. subtilis</i>	23
Abb. 9: Zellwandhydrolasen und ihre Zielbindungen	24
Abb. 10: Das <i>yqiHIK</i> Operon in <i>B. subtilis</i>	26
Abb. 11: Genetische Organisation des <i>degSU</i> Operons und Expression des <i>degS</i> Promotors	30
Abb. 12: Das Expressionsverhalten der <i>degU_{P2}</i> und <i>degU_{P3}</i> Promotoren in Abhängigkeit von Salz und dem DegS-DegU TCS	31
Abb. 13: Die Promotoraktivität von <i>degS</i> und <i>degU_{P3}</i> in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen	32
Abb. 14: Die Promotoraktivität von <i>degU_{P3}</i> in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen und von DegU~P	32
Abb. 15: Analyse der Promotoraktivität des <i>rapG-phrG</i> Systems	36
Abb. 16: Wachstumsanalyse der DegS-DegU TCS Mutanten unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen	37
Abb. 17: Wachstumsanalyse der DegS-DegU TCS Mutanten unter hyperosmotischen Bedingungen mit und ohne die Zugabe von Glycin-Betain	38
Abb. 18: Wachstumsanalyse der $\Delta proHJ$ Mutante in verschiedenen DegS-DegU TCS Mutanten	39
Abb. 19: Der Einfluss des DegS-DegU TCS auf die intrazelluläre Prolinkonzentration und die Promotoraktivität von <i>proH-treA</i>	41
Abb. 20: Salzabhängigkeit der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons ..	47
Abb. 21: Abhängigkeit diverser Gene von DegU~P unter physiologischen Bedingungen	49
Abb. 22: Abhängigkeit diverser Gene von DegU~P unter hyperosmotischen Bedingungen	52
Abb. 23: Schematische Darstellung des Genclusters, welches für Komponenten des T7SS in <i>S. aureus</i> und <i>B. subtilis</i> kodiert	54
Abb. 24: Wachstumsanalyse der $\Delta yueE-yueD$ Deletionsmutante	55
Abb. 25: Analyse der Promotoraktivität des <i>yueE-yueD</i> Operons	56
Abb. 26: Die Promotoraktivität von <i>yueE</i> in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen	57
Abb. 27: Die Induzierbarkeit des <i>yueE</i> Promotors durch ionische und nicht ionische Stoffe	58
Abb. 28: Schematische Darstellung der Regulation der Biofilmbildung	58
Abb. 29: Der Einfluss von Biofilmregulatoren auf die Expression des T7SS	60
Abb. 30: Die Salzinduktion von <i>yqiHIK</i> und deren Abhängigkeit von dem DegS-DegU TCS	61
Abb. 31: Northern Blot Analyse des <i>yqiHIK</i> Operons	62
Abb. 32: Osmotische Kontrolle der <i>yqiHIK</i> Expression	63
Abb. 33: Die AT-reiche Region von <i>yqiHIK</i>	64
Abb. 34: Zielgerichtete Mutagenese der putativen DegU~P Bindestellen	66
Abb. 35: Der Einfluss der Verkürzungen der intergene Region auf die <i>yqiH-treA</i> Fusion	69
Abb. 36: Die Auswirkung eines KinC-DegS Chimärenzyms auf die Promotoraktivität von <i>yqiHIK</i>	74
Abb. 37: Der Einfluss des RapG-PhrG Systems auf die Expression von <i>yqiHIK</i>	76
Abb. 38: Western Blot Analyse der Proteine YqiH, YqiI, YqiK und AprE	77

Abb. 39 : Modell zur transkriptionellen Regulation des T7SS	89
Abb. 40: Modell zur DegS-DegU abhängigen Regulation des <i>yqiHIK</i> Operons	93
Abb. 41: Model zur physiologischen Rolle der YqiH, YqiI und YqiK Proteine	101
Abb. 42: Signale die das DegS-DegU TCS aktivieren	104
Abb. 43: Konstruktion einer Deletion-Insertions-Mutante.....	124
Abb. 44: Promotorbereich von <i>yqiHIK</i>	125
Abb. 45: Promotorbereich von <i>degU</i>	127
Abb. 46: Aufbau des Kapillar-Transfers des Northern Blots	129
Abb. 47: Plasmid-Karte des mutagenisierten pJMB1 (pPink)	131
Abb. 48: Schematische Darstellung von pGP1331 (185).....	133
Abb. 49: Northern Blot Analyse des DegS-DegU TCS	157
Abb. 50: Northern Blot Analyse des <i>rapG-phrG</i> Operons	158
Abb. 51: Wachstumskurve der DegS-DegU TCS Mutanten unter physiologischen Bedingungen mit und ohne die Zugabe von Glycin-Betain.....	159
Abb. 52: Einfluss des DegS-DegU TCS auf die Prolinkonzentration im Überstand.....	160
Abb. 53: Reportergenanalysen der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz- Modulons.....	163
Abb. 54: Einfluss von SigB auf die Expression des T7SS	164
Abb. 55: Der Einfluss einer längeren <i>treA</i> Fusion auf die <i>yqiHIK</i> Promotoraktivität	165
Abb. 56: Standardgerade der Referenzproteine auf der HiLoad Superdex 200pg	165
Abb. 57. Gelfiltrationslauf von DegU aus <i>B. subtilis</i>	166
Abb. 58: Einfluss des DegS-DegU TCS auf das Wachstum von <i>B. subtilis</i> in Helmann Minimalmedium	168
Abb. 59: Einfluss der OD ₅₇₈ auf die Prolinkonzentration und die <i>proH-treA</i> Promotoraktivität	168

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die osmotische Induzierbarkeit der drei Promotoren des DegS-DegU TCS durch ionische und nicht ionische Stoffe	34
Tabelle 2: Vergleich des DegU~P Regulons mit dem Transkriptom salzgestresster Zellen	42
Tabelle 3: Bioinformatische Analysen der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons	44
Tabelle 4: Die AT-reiche Region von <i>yqiHIK</i> und ihre mögliche Rolle in der DegU~P Bindung	65
Tabelle 5: Zielgerichtete Mutagenese der putativen DegU~P Bindestellen	67
Tabelle 6: Zielgerichtete Mutagenese des SigA-abhängigen <i>yqiHIK</i> Promotors in Abhängigkeit des DegS-DegU TCS	71
Tabelle 7: Expression der Amidasen in verschiedenen Transkriptomanalysen	91
Tabelle 8: <i>E. coli</i> Stämme	108
Tabelle 9: <i>B. subtilis</i> Stämme	108
Tabelle 10: Während dieser Arbeit konstruierte Stämme	109
Tabelle 11: Plasmide	113
Tabelle 12: Oligonukleotide	114
Tabelle 13: Komponenten des Helmann Minimalmediums	117
Tabelle 14: Antibiotika und Medienzusätze	118
Tabelle 15: Komponenten des LS-Mediums	120
Tabelle 16: Mutationen des <i>yqiHIK</i> Promotors	125
Tabelle 17: Mutationen der SigA-Promotoren von <i>degU</i>	127
Tabelle 18: pJMB1 Derivate und die daraus resultierenden <i>B. subtilis</i> Stämme	132
Tabelle 19: Zusammensetzung von einem 13% SDS Agarosegel	138

Abkürzungsverzeichnis

5' UTR	5' untranslatierter Bereich
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BS	Bindestelle
CmI ^R	Chloramphenicol-Resistenz
C-terminal	Carboxy-terminal
DTT	Dithiothreitol
ECF	Extrazytoplasmatische Funktion (extracytoplasmic function)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ery ^R	Erythromycin-Resistenz
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
HMM	Helmann Minimalmedium
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
MurNAc	N-Acetyl-Muraminsäure
N-terminal	Amino-terminal
NaCl	Natriumchlorid
OD ₅₇₈	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pNPG	para-Nitrophenyl-α-Glucopyranosid
RBS	Ribosomenbindestelle
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sig (σ)	Sigmafaktor
SMM	Spizizen's Minimal-Medium
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TCS	Zwei-Komponenten-System (Two component system)
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
T7SS	Typ VII Sekretionssystem
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
x g	relative Zentrifugalkraft als vielfaches der Erdbeschleunigung
Zeo ^R	Zeocin Resistenz

I Zusammenfassung

Die Verfügbarkeit von Wasser ist essentiell für die Entwicklung von lebenden Zellen. In den obersten Bodenschichten, dem natürlichen Lebensraum des Gram-positiven Bodenbakteriums *Bacillus subtilis*, ist dieser diversen Stressfaktoren ausgesetzt, die die Verfügbarkeit von Wasser beeinflussen. Trockenperioden führen zu einem hyperosmotischen Stress für die Zelle, der letztendlich die Plasmolyse der Zelle zur Folge haben könnte. Um diesen Wasserverlust zu vermeiden, ist *B. subtilis* in der Lage durch Synthese oder Transport compatible Solute zu akkumulieren und sich dadurch vor den negativen Auswirkungen hoher Osmolarität/Salinität zu schützen. In Hinblick auf die zelluläre Osmoadaptation konnte aber bisher noch nicht geklärt werden wie *B. subtilis* Osmostress wahrnimmt. Die Stresswahrnehmung in Bakterien erfolgt oftmals über Zwei-Komponenten Systeme (TCS). In Transkriptomanalysen hyperosmotisch gestresster *B. subtilis* Kulturen wurde das DegS-DegU TCS als einziges salzinduzierbares System identifiziert (299). Dieses System kontrolliert eine Vielzahl von Prozessen die charakteristisch für die Übergangsphase von der exponentiellen zur stationären Phase und während zellulärer Differenzierungswege sind.

Das DegS-DegU TCS konnte zwar schon als salzinduziert identifiziert werden, aber wie genau es auf osmotischen Stress reagiert konnte nicht geklärt werden. Im Verlauf meiner Promotion konnte ich mittels Reporteranalysen die Salzinduktion des *degSU* Genclusters nachweisen. Weiterhin konnte ein positiver Feedback Loop von DegU~P auf den eigenen Promotor (*degUP₃*) erstmals unter Salzstress nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich, dass die Expression des *degUP₃* Promotors nur bei hohen Salzkonzentrationen ($\geq 0,8$ M NaCl) erfolgt. Das DegS-DegU TCS wird durch zwei Proteine (RapG und PhrG) reguliert (236), die in dieser Studie durch Reporteranalysen ebenfalls als salzinduziert identifiziert wurden. Die phänotypische Charakterisierung zeigte, dass die Deletion des DegS-DegU TCS unter hyperosmotischen Bedingungen zu einer geringen Verlängerung der Lag-Phase von *B. subtilis* Kulturen führt. Interessanterweise führte die Hyperphosphorylierung von DegU zu einem stark verbesserten Wachstum, sowohl unter isoosmotischen als auch unter hyperosmotischen Bedingungen. Dieser Phänotyp konnte nicht auf die Akkumulation des *de novo* synthetisierten kompatiblen Soluts Prolin zurückgeführt werden.

Um eine mögliche Beteiligung von DegS-DegU in der Adaptation an hochsaline Bedingungen zu studieren, wurden die Gene, die DegU~P reguliert, in Hinblick auf ihre Salzinduktion charakterisiert. Dabei kristallisierte sich heraus, dass die Hälfte des DegU~P Regulons (197) salzinduzierbar ist, jedoch die Salzinduktion unabhängig von DegS-DegU ist. Dies zeigte sich durch Reporterstudien der Gene aus dem Überlapp des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons, die trotz einer Deletion des DegS-DegU TCS immer noch salzinduzierbar waren. In diesem Zusammenhang wurde das vor kurzem identifizierte Typ VII Sekretionssystem (T7SS, *yukE-yueD*) detaillierter analysiert. Die Deletion des T7SS führte unter hyperosmotischen Bedingungen im *B. subtilis* 168 Laborstamm zu keinem Phänotyp. Es zeigte sich aber, dass dessen Expression salzinduzierbar ist und durch das DegS-DegU TCS reguliert wird. Reporteranalysen deckten auf, dass DegU~P unter physiologischen Bedingungen als Aktivator und unter hyperosmotischen Bedingungen möglicherweise als Repressor agiert. Weiterhin wurde eine Beteiligung der Biofilmregulatoren SinR, ein Repressor, und RemA, ein Aktivator, nachgewiesen.

Der Schwerpunkt meiner Arbeit fokussierte sich auf die Analyse der Regulation des osmotisch induzierbaren *yqiHIK* Operons und dessen Regulation durch das DegS-DegU Zwei-Komponenten System. Das *yqiHIK* Operon, welches in verschiedenen Transkriptomstudien (172, 230, 299) als stark salzinduzierbar identifiziert wurde, steht ebenfalls unter der Kontrolle des DegS-DegU TCS (86). Reporteranalysen und ein Northern Blot zeigten, dass das Operon als eine Einheit transkribiert wird und diese salzinduzierbar ist. Weiterhin wiesen diese Analysen darauf hin, dass DegU~P in diesem Fall als Aktivator fungiert. Durch Verkürzungen einer stromaufwärts gelegenen AT-reichen Region und der gerichteten Mutagenese putativer DegU~P Bindestellen, konnte eine Bindestelle von DegU~P in einem Abstand von 203 bp zum Transkriptionsstart identifiziert werden. Durch Western Blot Analysen konnte die N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase Yqil im extrazellulären Bereich lokalisiert werden und die Glycerophosphodiester Phosphodiesterase Yqik im Zytoplasma. Dies erlaubte eine neue Beschreibung der physiologischen Funktion der von *yqiHIK* kodierten Proteine.

Die Eigenschaften des *yqiHIK* Promotors wurden außerdem als Hilfsmittel genutzt um die Rolle von DegS-DegU während der Osmoadaptation näher zu charakterisieren. Durch Mutationen im SigA-abhängigen Promotor von *yqiHIK*, die das Expressionsniveau verbessern, konnte dieser trotzdem durch Salzstress induziert werden, obwohl das DegS-DegU TCS deletiert wurde. Eine synthetisch hergestellte membrangebundene Kinase (KinC-DegS) führte ebenfalls zu einer Salzinduktion von *yqiHIK*, obwohl diese Hybridkinase nicht auf ein osmotisches Signal reagiert (193). Entgegen eines zuvor gemachten Vorschlags (279) konnte also in dieser Dissertation gezeigt werden, dass DegS nicht der global-agierende Salzsensoren in *B. subtilis* ist. Das DegS-DegU System trägt aber zur Transkriptionskontrolle einer Vielzahl von Salzstress-regulierten Genen von *B. subtilis* bei.

II Summary

Water availability is essential for the development of living cells. In the upper layers of soil, the natural habitat of the gram-positive soil bacterium *B. subtilis*, it is faced to various stresses that have an influence on the availability of water. Long dry periods lead to a hyperosmotic stress that finally could cause plasmolysis. To avoid this loss of water, *B. subtilis* is able to accumulate compatible solutes by either transporting them or synthesizing them and to protect itself from the negative impacts of high osmolality/salinity. In terms of the osmoadaptation the big question is how *B. subtilis* is able to sense osmotic stress. Two component systems (TCS) play a crucial role in sensing environmental stresses. Transcriptomic data of osmotically stressed *B. subtilis* cells revealed that only the DegS-DegU TCS is salt inducible (299). This system controls different processes which are characteristic for the transition from the exponential to the stationary phase and for cellular differentiation procedures.

The DegS-DegU TCS was identified to be salt inducible, however the exact mechanism how it reacts to osmotic stress remained unclear (299). In the course of my study reporter gene studies confirmed the salt induction of the *degSU* operon. For the first time the positive feedback loop of DegU~P on its own promoter (*degU_{P3}*) under salt stress conditions was shown. The expression of *degU_{P3}* is only activated upon high salt concentrations (≥ 0.8 M NaCl). Reporter gene studies of two proteins (RapG and PhrG) that regulate the TCS (236), were shown to be salt inducible. Phenotypic characterisations highlighted the role of the DegS-DegU TCS during the growth of *B. subtilis*. The deletion of the DegS-DegU TCS lead to a slightly longer lag phase under hyperosmotic conditions. Interestingly the hyperphosphorylation of DegU leads to a strong enhancement of growth under physiological and hyperosmotic conditions. This phenotype is not due to the *de novo* synthesis of the compatible solute proline.

To analyse a putative role of DegS-DegU in the adaptation to high salinity, genes which are regulated by DegU~P were analysed in terms of their salt induction. Here I could show that half of the DegU~P regulon (197) is salt inducible, but this induction is independent of the DegS-DegU TCS. This was shown by reporter gene analysis of genes which belong both to the DegU~P regulon as well as to the salt modulon. These genes were still salt inducible, although the DegS-DegU TCS was deleted. In conjunction with this, the recently identified type VII secretion system (T7SS, *yukE-yueD*) was analysed in detail. Deletion of the T7SS revealed no phenotype under hyperosmotic conditions in *B. subtilis* 168 laboratory strain. Reporter gene analysis showed that the T7SS is salt inducible and regulated by the DegS-DegU TCS. Under physiological conditions DegU~P acts a transcriptional activator, but under hyperosmotic conditions DegU~P seems to be a repressor. Furthermore, the involvement of the biofilm regulators SinR, a repressor, and RemA, an activator, was proven.

The main focus of my studies was the analysis of the regulation of the osmotically inducible *yqiHIK* operon and its regulation by the DegS-DegU two component system. The *yqiHIK* operon, which was shown to be highly salt inducible in different transcriptomic data (172, 230, 299), is additionally regulated by the DegS-DegU TCS (86). Reporter gene and Northern blot analysis showed that *yqiHIK* is transcribed in one operon, which is salt inducible. Furthermore, the analysis highlighted the role of DegU~P as a transcriptional activator. Truncations of a far upstream AT-rich region and site directed mutagenesis of putative DegU~P binding sites, highlighted a DegU~P binding site at a distance of 203 bp from the transcriptional start site. The N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase YqiI was localized by Western blot analysis in the extracellular space and the glycerophosphodiester phosphodiesterase YqiK in the cytoplasm. This results enables me to suggest a physiological function for the *yqiHIK* encoded proteins.

The characteristics of the *yqiHIK* operon were further used as a device to analyse the role of the DegS-DegU TCS during the osmoadaptation. The promoter activity of the SigA-type promoter of *yqiHIK* was increased by site directed mutagenesis and showed a salt induction which is independent of the TCS DegS-DegU. Additionally the *yqiHIK* operon was still salt inducible, although the putative osmosensor was membrane bound instead of cytoplasmically localized by a synthetically produced chimeric enzyme (KinC-DegS). This chimeric enzyme does not respond to osmotic stresses (193). Contrary to a prior hypothesis (279), I could show that DegS is not the globally-acting salt sensor in *B. subtilis*. The DegS-DegU TCS however contributes to the transcriptional control of a multitude of salt stress regulated genes in *B. subtilis*.

III Einleitung

Mikroorganismen sind in der Lage sich in vielen verschiedenen Habitaten anzusiedeln. Dabei können sie sowohl außergewöhnliche Lebensräume, wie zum Beispiel heiße Quellen [*Sulfolobus solfataricus*, (29)] oder die Tiefen des Ozeans [*Halomonas salaria* (249)], als auch moderate Lebensräume besiedeln. Jedoch können letztere, wie zum Beispiel die obersten Bodenschichten, bemerkenswert komplexe und dynamische Umgebungen für Bakterien darstellen. Der Erdboden besitzt eine große Menge an metabolisch aktiver Biomasse in der alle drei Domänen des Lebens vertreten sind. Hier verändert sich die Umwelt stetig. Durch Trockenperioden, viel Regen oder aber auch durch Düngen des Bodens kommt es zu Veränderungen im pH, der Temperatur, des Sauerstoffgehalts und der Osmolarität. Mikroorganismen die hier kolonisieren sind in der Lage sich erfolgreich an diese Schwankungen anzupassen, häufig über eine schnelle Änderung des Transkriptionsprofils (2, 164, 261). Einer der Vertreter, der im Boden lebenden Bakterien ist der Modelorganismus *Bacillus subtilis*, der durch verschiedene zelluläre Prozesse (Motilität, natürliche Kompetenz, Biofilmbildung, Sporulation und Kannibalismus) in der Lage ist, sich an die verändernden Umweltbedingungen zu adaptieren (3, 194, 287).

1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis ist ein weit verbreitetes Gram-positives Bakterium, welches zum Phylum der Firmicuten gehört. Es ist ein stäbchenförmiger Mikroorganismus mit einer Größe von 2 – 3 µm Länge und ist peritrich begeißelt (109, 281). Es konnte nicht nur aus dem Boden, sondern auch aus marinen Habitaten und dem Intestinaltrakt isoliert werden (148, 259, 307). Das Bakterium besitzt eine chemoorgano-heterotrophe Lebensweise und ist fakultativ anaerob (114). *B. subtilis* ist ein interessantes Forschungsobjekt und ein wichtiger Bestandteil der biotechnologischen Industrie. Auf Grund des komplett sequenzierten Genoms von *B. subtilis* (179) und einer großen Vielfalt an verfügbaren Werkzeugen zur genetischen Modifikation sind circa 60% der kommerziell genutzten Enzyme von *Bacillus* Spezies produziert, wie zum Beispiel alkaline Proteasen und Amylasen (251, 292).

In den diversen Habitaten die *B. subtilis* besiedelt ist er sich beständig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Um auf diese reagieren zu können hat *B. subtilis* komplexe Signalwege und Regulationsmechanismen entwickelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass genotypisch identische Populationen sich phänotypisch unterscheiden und somit unterschiedliche Subpopulationen entstehen. Hierbei exprimiert die eine Subpopulation bestimmte Gene, der andere Teil der Population jedoch nicht. Dieses Phänomen wird Bistabilität genannt (80). Eine Subpopulation produziert dadurch andere Signalmoleküle oder kann auf solche antworten, sodass innerhalb einer Gemeinschaft letztlich unterschiedliche Zelldifferenzierungen und somit Fähigkeiten entstehen. In *B. subtilis* konnte diese Art der Bistabilität sowohl bei den Differenzierungsprozessen Sporulation, Kannibalismus, Kompetenz und Motilität als auch bei der Produktion von extrazellulären Proteasen beobachtet werden (80, 194, 287). Sowohl die Differenzierungsprozesse Motilität, Kannibalismus, als auch Sporulation und Biofilmbildung unterliegen direkt oder indirekt den drei Hauptregulatoren Spo0A, ComA und DegU (Abb. 1) (286).

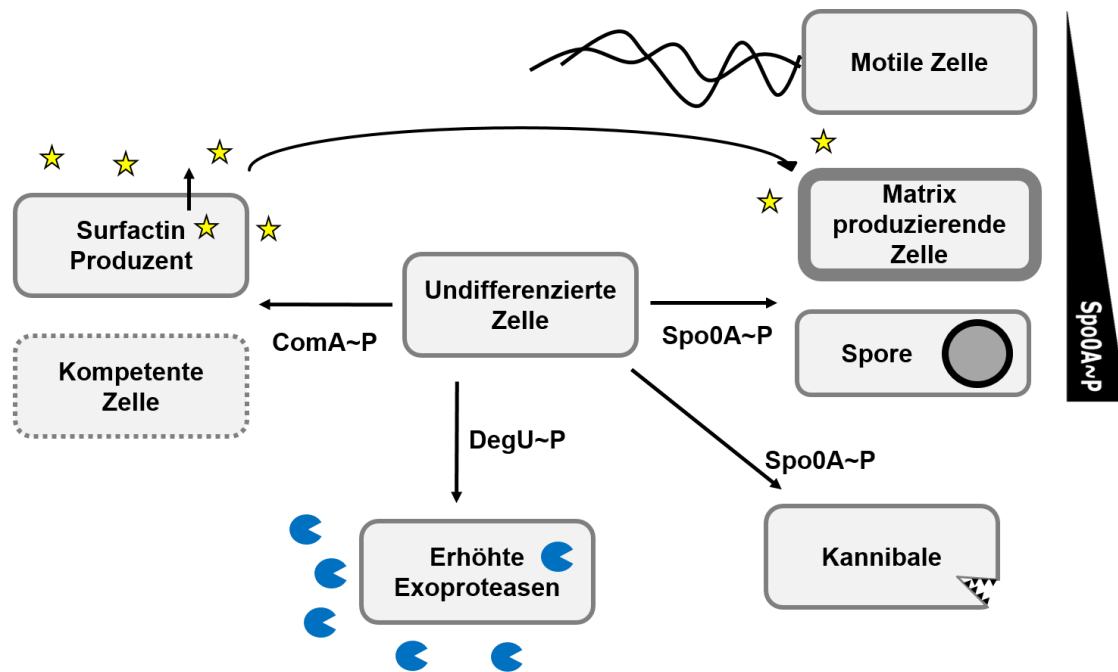


Abb. 1: Differenzierungsprozesse in *B. subtilis*

Schematisch abgebildet sind die verschiedenen Zelltypen, die innerhalb einer *B. subtilis* Population existieren. Die Sterne symbolisieren die Surfactinproduktion. Die blauen geschnittenen Kreise stellen Exoproteasen dar. Die Konzentration an Spo0A zeigt an, dass verschiedene Menge von Spo0A~P nötig sind, um gewisse Differenzierungswege einzuschlagen. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich im folgenden Text. [modifiziert nach López und Kolter (194)].

1.1 Differenzierungsprozesse in *B. subtilis*

Eine Voraussetzung für die selektive Genexpression ist, dass die Hauptregulatoren (Spo0A, ComA und DegU) in ihrer phosphorylierten und somit aktiven Form vorliegen (Abb. 1). Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Spo0A, DegU und ComA wird dabei durch die zugehörigen Histidinkinasen (auch Sensorkinasen genannt) gewährleistet. Die Aktivierung der Antwortregulatoren DegU sowie ComA erfolgt durch die Sensorkinasen DegS (71, 221) und ComP (330). Der Phosphorylierungsstatus von Spo0A wird über verschiedene transkriptionelle Wege kontrolliert und post-translationell über fünf Histidinkinasen (KinA - E) indirekt oder direkt über Spo0F und Spo0B reguliert (153, 184). Ein weiterer Regulationsmechanismus für Spo0A sind die sogenannten Rap Phosphatasen die mit Spo0B und Spo0F interagieren, diese dephosphorylieren und so die Konzentration an Spo0A~P reduzieren (256, 262). Rap Proteine werden wiederum von Phr Peptiden inhibiert. In *B. subtilis* gibt es 8 Phr Peptide und 11 Rap Proteine, wobei jedes Phr Peptid in einem Operon mit dem dazugehörigen Rap Protein liegt. Phr Peptide werden zunächst als Prä-Peptid translatiert und haben ein N-terminales Sekretionssignal (Sec-Pathway). Nach der Sekretion und der Prozessierung zu einem Pentapeptid wird dieses wieder über einen Oligopeptidtransporter (Opp) importiert und kann dann in der Zelle das dazu gehörige Rap Protein inhibieren (256).

1.1.1 Biofilmbildung

Die Motilität der bakteriellen Zellen tritt während der exponentiellen Phase auf und nimmt während der stationären Phase ab (160). Hierbei ist *B. subtilis* in der Lage je nach Umgebung entweder zu schwimmen oder zu schwärmen. Die Motilität wird von niedrigen Konzentrationen von Spo0A~P gewährleistet, beziehungsweise hohe Konzentrationen inhibieren das *fla/che* Operon. Dieses Operon besteht aus 31 Genen, die für den Basalkörper der Flagellen, das Chemotaxis System und den Sigmafaktor σ^D kodieren. σ^D wird wiederum für die Expression des *hag* Lokus, welcher für das eigentliche Flagellenfilament nötig ist und *motA* und *motB*, welche für Motorproteine kodieren, benötigt. Letztendlich kontrolliert σ^D noch 3 Autolysine (*lytA*, *lytD* und *lytF*) wodurch gewährleistet wird, dass bewegliche Zellen keine filamentösen Strukturen bilden (207). Sobald Biofilm-initiierende Bedingungen vorhanden sind verlieren diese motilen Zellen ihre Beweglichkeit und fangen an eine extrazelluläre Matrix zu bilden. Es gibt fünf Stufen der Biofilmbildung: Oberflächenanlagerung (I); Bildung einer Monoschicht (II), Migration um Multischicht-Mikrokolonien zu bilden (III), Produktion der extrazellulären Matrix (IV) und schließlich die Reifung zum Biofilm mit der charakteristischen 3 dimensional Struktur (V) (233). Bei der Biofilmbildung ist zu beachten, dass der weit verbreitete Laborstamm JH642 nicht in der Lage ist einen robusten Biofilm auf einer Agaroberfläche zu bilden. Dies liegt an Mutationen, welche in *sfp*, *epsC*, *degQ* und *swrA* lokalisieren (211). Interessanterweise konnte aber eine Forschungsgruppe zeigen, dass der Laborstamm JH642 in der Lage ist einen sogenannten „submerged“ (Oberflächen angehafteten) Biofilm auf Polyvinylchlorid (PVC) zu bilden (111). Die extrazelluläre Matrix des Biofilms besteht hauptsächlich aus Exopolysacchariden (*epsA-O*), dem Proteinen TasA (in einem Operon mit *tapA* und *sipW*) (36) und einem Oberflächenprotein BslA. Der Hauptregulator für die Biofilmbildung ist SinR, welcher konstitutiv exprimiert wird. In beweglichen Zellen reprimiert SinR die Gene für die Matrixbildung und fördert indirekt die Zellteilung und Motilität (36). SinR bindet direkt an das *epsA-O* und *tapA-sipW-tasA* Operon und reprimiert dessen Expression (Abb. 2) (62, 160). Auch die Biofilmbildung wird durch Spo0A~P indirekt reguliert, da moderate Konzentrationen an Spo0A~P nötig sind um SinI zu aktivieren (93). SinI ist der Antagonist von SinR und wird nur in einer Subpopulation exprimiert, in der Spo0A aktiviert ist. Sobald SinI aktiv ist inhibiert es SinR, sodass die Gene für die Biofilmbildung transkribiert werden (186, 187). Neben den Matrixgenen reprimiert SinR SlrR, welches essentiell für die Kontrolle der Biofilmbildung ist (59, 63, 168). Diese Kontrolle findet auf zwei Wegen statt. Zum einen kann SlrR SinR binden, sodass SinR nicht mehr die Matrixgenpromotoren und den *slrR* Promotor reprimiert. Erhöhte Konzentrationen an SlrR führen zu einem SlrR-SinR Komplex, welcher die Motilitätsgene sowie Gene, die in der Zellteilung (Autolysine) involviert sind inhibiert. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass die Proteine RemA und RemB die Expression von *eps* und *tapA-sipW-tasA* über SlrR und einen SlrR-unabhängigen Weg aktivieren, die genauen Mechanismen sind bisher unbekannt (334).

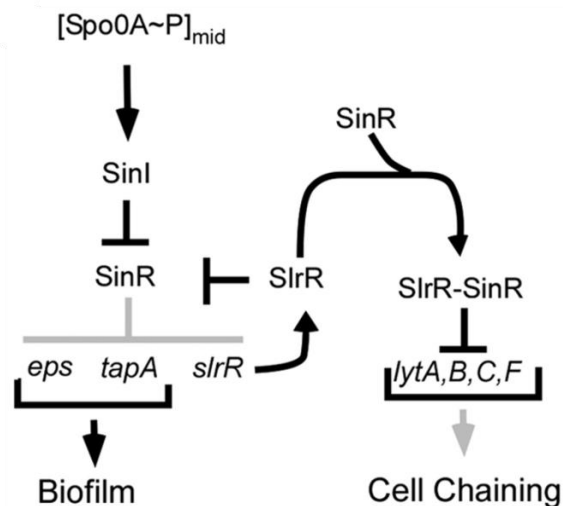


Abb. 2: Regulation der Biofilmbildung in *B. subtilis*

Dargestellt sind die regulatorischen Mechanismen der Biofilmbildung, welche unter der Kontrolle von Spo0A~P sind und die Regulation der Autolyse durch SinR. Die hellgrauen Formen geben an, dass diese Prozesse bei intermediären Konzentrationen von Spo0A~P inaktiv sind (205)

1.1.2 Sporulation

In einem Biofilm gibt es Bereiche in denen Sporulation stattfindet. Es wurde schon für andere Bakterien, zum Beispiel *Myxococcus xanthus*, beschrieben, dass sich in den „Antennenstrukturen“ Sporen befinden und dies konnte auch für *B. subtilis* gezeigt werden (37, 295). *B. subtilis* initiiert die Sporulation in Antwort auf Hunger oder eine hohe Zelldichte (105). Die entstehenden Endosporen sind resistent gegen hohe Temperaturen, Druck, Strahlung und verschiedene chemische Einflüsse. Die Sporulation läuft wie folgt ab (Abb. 3): Die Zelle erlebt eine asymmetrische Teilung bei der eine Mutterzelle und eine Vorspore entstehen. Nach der asymmetrischen Teilung läuft eine Sigmafaktorkaskade ab, die verschiedene Gene aktiviert und so eigenständige Expressionsprofile in den verschiedenen Kompartimenten hervorruft (293). Die weiteren Schritte der Sporulation beinhalten die Einstülpung der Vorspore und die Reifung zur Spore mit Bildung der Kortex und der Sporenhülle. (260). Letztendlich lysiert die Mutterzelle und die resistente Endospore wird frei gelassen (175). Die Sporulation ist abhängig von dem Antwortregulator Spo0A~P und dem alternativen Sigmafaktor σ^H , wobei *spo0H* (welches für σ^H kodiert) indirekt durch Spo0A kontrolliert wird. Sehr hohe Konzentrationen an Spo0A~P sind nötig um die Sporulation auszulösen. Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Konzentrationen von Spo0A~P von verschiedenen Kinasen abhängen. KinC und KinD sind nicht so effizient in der Phosphorylierung von Spo0A wie KinA. Abhängig davon welche Kinase aktiviert wird entscheidet ob die Zellen sporulieren oder einen Biofilm bilden. Dabei ist KinA wichtig für die Sporulation und KinC und KinD für die Biofilmbildung (111, 170). Sobald eine Verbesserung der Umweltbedingungen stattfindet, sind Sporen in der Lage das vegetative Wachstum erneut aufzunehmen, was als Keimungsprozess bezeichnet wird (11, 285). Sporulation ist ein energiereicher Prozess und ab einem gewissen Punkt während der Initiation der Sporulation gibt es kein Zurück (point of no return). Jedoch hat *B. subtilis* Strategien um die Sporulation hinauszuzögern. Beim Eintritt in die Sporulation sekretiert eine Subpopulation von *B. subtilis* extrazelluläre „Killing“ Faktoren, diese lysieren nicht sporulierende Geschwister, da diese keine Immunitätsproteine besitzen. Durch das

Töten der anderen Zellen werden Nährstoffe freigelassen, welche den Kannibalen zur Verfügung stehen (101). Dieser Prozess ist möglich, da *B. subtilis* zunächst nicht vollständig in die Sporulation Eintritt, erst wenn die asymmetrische polare Teilung stattfindet kann *B. subtilis* diesen Prozess nicht mehr umkehren und geht den langen und Energie erfordernden Weg der Sporulation, auch wenn Nährstoffe wieder vorhanden sind.

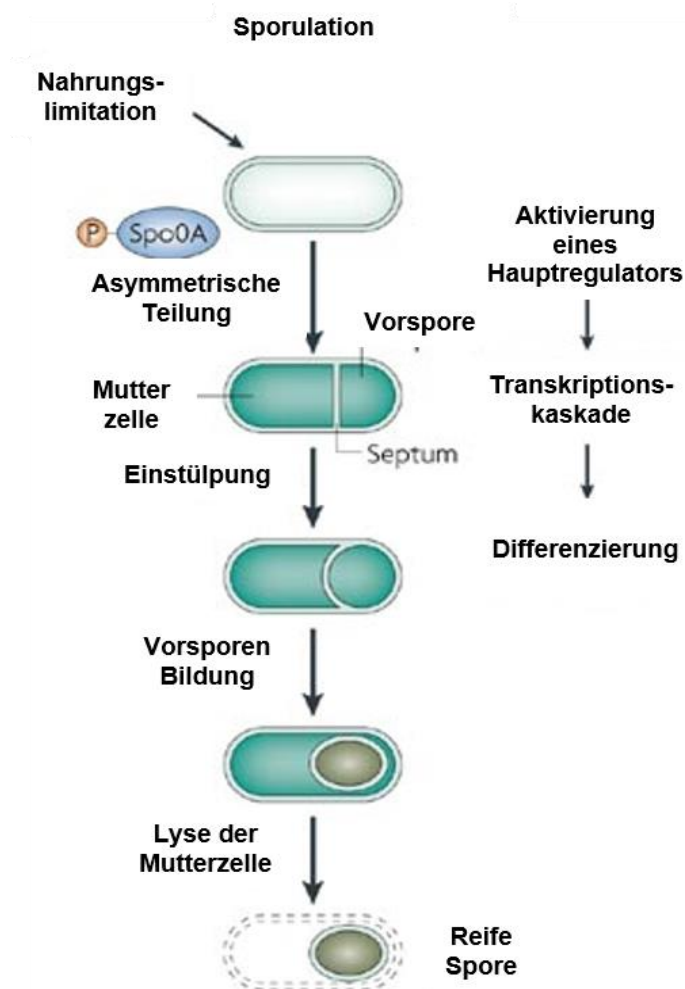


Abb. 3: Der Ablauf der Sporulation in *B. subtilis*

Gezeigt sind die verschiedenen Stufen der Sporulation, angefangen bei der Initiierung durch Nahrungslimitation via Spo0A~P über die asymmetrische Teilung, die Einstülpung, die Bildung der Vorspore und die Lyse der Mutterzelle. Durch den letzten Schritt wird die reife Endospore freigesetzt (64).

1.1.3 Kannibalismus und genetische Kompetenz

Kannibalismus wird in *B. subtilis* über zwei Gencluster ermöglicht, die für Toxine kodieren. Das *skf* (sporulating killing factor) Cluster besteht aus acht Genen und es zeigt Ähnlichkeiten zu Operons die in die Synthese von Bacteriocinen involviert sind. Bacteriocine sind ribosomal synthetisierte antimikrobielle Stoffe. Bis heute konnte aber der Tötungsfaktor aus diesem Cluster nicht identifiziert werden. Verschiedene Experimente identifizierten dieses Operon aber als essentiell für den Kannibalismus (101). Das andere Cluster besteht aus zwei konvergenten Operons: *sdpABC* und *sdpRI*. SdpC ist das Toxin und die Proteine, für die das *sdpRI* Operon kodiert, gewährleisten die Immunität. Beide Operons unterliegen der positiven Regulation von Spo0A~P (84). Im Wildtyp werden Tötungsfaktoren in Zellen exprimiert, die auch Spo0A exprimieren, sodass Spo0A negative Zellen lysiert werden. Dadurch werden Nährstoffe zur Verfügung gestellt und die Sporulation wird angehalten bis die Nährstoffe aufgebraucht sind. Erneut

werden die hungernden Zellen durch die Bistabilität in Spo0A aktive und inaktive Zellen geteilt und neue kannibalistische Phasen entstehen. Dies geschieht solange bis die gesamte Kultur sporuliert ist. Dadurch wird die Sporulation immer wieder ein wenig hinausgezögert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass *B. subtilis* nicht nur in der Lage ist seine Geschwister zu töten, sondern Skf wirkt auch gegen *Xanthomonas oryzae* (Gram-positives Pflanzenpathogen), sodass *B. subtilis* sich in seiner natürlichen Umgebung mit Nahrungsquellen versorgen kann (189). Bei Eintritt in die stationäre Phase ist *B. subtilis* nicht nur in der Lage metabolisch inaktive Endosporen zu bilden (260, 273), sondern auch extrazelluläre DNA (eDNA) aufzunehmen (79, 81). Dies geschieht durch dessen natürliche Kompetenz. Auch hierbei spielt Spo0A eine wichtige Rolle, in dem es ComA, ein Protein der Kompetenzentwicklung, reguliert. ComA aktiviert die Expression des Hauptregulators ComK. Die Entstehung der Kompetenz beruht auf dem Quorum Sensing System ComX–ComP–ComA (198). ComX ist ein Pheromon, welches bei einer hohen Zelldichte die Histidinkinase ComP aktiviert, welche wiederum ComA phosphoryliert, sodass ComK aktiviert werden kann. ComA~P aktiviert aber auch RapA, RapB und RapE, sodass die Phosphorylierung von Spo0A inhibiert wird und Zellen, die Kompetenz entwickeln nicht gleichzeitig sporulieren können (12). Während der späten exponentiellen Phase konnte gezeigt werden, dass *B. subtilis* eDNA aktiv sekretiert und diese auch von anderen kompetenten Zellen aufgenommen werden kann. Der genaue Mechanismus der eDNA Freisetzung ist bisher noch nicht bekannt, der Hauptregulator DegU ist aber in diesen Prozess involviert (346). DegU~P spielt auch eine wichtige Rolle bei der Synthese von extrazellulären, abbauenden Enzyme, die ein weiteres wichtiges Charakteristikum von *B. subtilis* darstellen. Die Enzyme, wie zum Beispiel die Exoprotease AprE (Subtilisin), Bpr (Bacillipeptidase), die extrazelluläre Alpha-Amylase AmyE und die Exopolysaccharase SacB (Levansucrase), sind nicht nur in der Lage von der Zelle sekretiertes Material abzubauen, sondern können auch Produkte abbauen, die entstehen, wenn Zellen lysieren, wie es in der stationären Phase der Fall ist. Die Exoenzyme sind also dafür da um Nahrung für die Gemeinschaft bereit zu stellen (220). Die Transkription von *degU* wird während der stationären Phase angeschaltet (315), sodass eine erhöhte Exoproteaseaktivität während der stationären Phase stattfindet. Jedoch verhindern diese hohen Konzentrationen an DegU~P die Motilität von *B. subtilis* (6, 167, 236, 317), sodass das, durch die Exoproteasen, erhöhte Nahrungsangebot effektiv genutzt werden kann.

Neben der Regulation von Exoproteasen konnten durch Transkriptomanalysen zwei DegU Regulons identifiziert werden (197, 241), die einen Überlapp zu den Transkriptomdaten salzgestresster Zellen aufweisen (299). Zwei der am stärksten salzinduzierten Gene waren *yqiH* und *yqil*. Bioinformatische Analysen ergaben, dass es sich hierbei vermutlich um ein Lipoprotein (YqiH) und eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase (Yqil) handelt. Beide Gene werden in einem Operon mit *yqiK* transkribiert, welches für eine putative Glycerophosphodiester Phosphodiesterase kodiert. In einer vorangegangene Dissertation konnte gezeigt werden, dass dieses stark salzinduzierte Operon durch das DegS–DegU Zwei-Komponenten System reguliert wird (86). Transkriptionsanalysen des, durch Primerextension-Analyse identifizierten, SigA-abhängigen Promotors zeigten, dass dieser Promotor durch DegU~P positiv reguliert wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass das Operon im Vergleich zu anderen osmotisch induzierbaren Operons (*proHJ*, *opuAA-AB-AC*) ein neues Induktionsmuster aufweist und dass diese Salzinduktion von einer stromaufwärts gelegenen AT-reichen Region abhängt (41, 87, 134). Bisher konnte aber noch nicht gezeigt werden, in wie weit DegU~P genau die Expression von *yqiHIK* reguliert und ob die AT-reiche

Region hierbei eine Rolle spielt. Weiterhin konnten bisher nur Hypothesen über die funktionelle Rolle der Amidase Yqil postuliert werden, da sie zwar vermutlich sekretiert wird, aber keine für Autolysine typische Zellwandbindedomäne besitzt. Ferner wird für das DegS-DegU Zwei-Komponenten System vermutet, dass dieses in die Salzstressantwort von *B. subtilis* involviert ist und für DegS wurde postuliert, dass diese Kinase der Salzstresssensor in *B. subtilis* ist (279).

Im fortlaufenden Text soll nun zunächst aufgeführt werden, wie *B. subtilis* sich an hyperosmotische Bedingungen anpassen kann und welche Rolle dabei Zwei-Komponenten Systeme spielen. Des Weiteren wird der Aufbau, die Synthese und das Recycling des Mureinsacculus von *B. subtilis* hervorgehoben. Dabei liegt ein Schwerpunkt auf den Zellwand-modifizierenden Enzymen, im Besonderen auf der Amidase Yqil.

2 Osmoregulation in *B. subtilis*

Als Mikroorganismus der unter anderem in den oberen Schichten des Bodens lebt, ist *B. subtilis* besonders stark von Fluktuationen der abiotischen Faktoren betroffen (217). Neben Veränderungen der Temperatur, des pHs, der Strahlung und Verfügbarkeit von Nährstoffen spielt Wasser eine kritische Rolle. Regenfälle und Trockenperioden lassen die Verfügbarkeit von Wasser schwanken, was schlussfolgernd zu Veränderungen in der Osmolarität führt. Jede Bakterienzelle ist von einer semipermeablen Zytoplasmamembran umgeben, welche die Bewegung von Ionen und Metaboliten einschränkt, Wasser jedoch frei diffundieren kann. Die Osmolarität im Zytoplasma ist größer als die der Umgebung, da Nukleinsäuren, Proteine und Metaboliten das osmotische Potential beeinflussen. Dieses erhöhte zytoplasmatische Potential führt zu einem Wassereinstrom entlang des osmotischen Gradienten. Dadurch entsteht ein hydrostatischer Druck, der sogenannte Zellturgor (39, 337). Die Zellmembran ist in der Lage einem gewissen Druck stand zu halten, wird dieser aber überschritten führt dies zur Zerstörung der Zellmembran (268). Mikroorganismen müssen ihre gelösten Stoffe im Zytoplasma so einstellen, dass immer ein positiver Zellturgor entsteht, da er für eine korrekte Zellelongation und Zellteilung eine wichtige Rolle inne hat (39, 60, 261). Dieser Zellturgor drückt die Zytoplasmamembran von innen gegen die Zellwand und ist somit auch formgebend. Der Zellinnendruck kann durch verschiedenen Methoden ermittelt werden (69) und für *B. subtilis* konnte ein Wert von 1,9 MPa (19 atm) bestimmt werden (332). Um das Überleben und das Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen, wie Hitze-, Ethanol-, Säure-/Alkalistress, Nährstoffmangel, Sauerstofflimitation, oder einer erhöhten Salzkonzentration zu gewährleisten ist *B. subtilis* in der Lage verschiedene Stressantworten zu geben (24, 120, 121, 319). Hierbei garantiert eine generelle Stressantwort einen Schutz gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen unabhängig vom Stressfaktor. Meist wird die generelle Stressantwort durch einen oder mehrere Regulatoren kontrolliert, wobei in *B. subtilis* gezeigt wurde, dass der alternative Transkriptionsfaktor σ^B für diese Regulation verantwortlich ist (121, 319). Neben der generellen Stressantwort wird auch eine spezifische Stressantwort, je nach Stressart, induziert, welche zusammen mit der generellen Antwort eine effiziente Adaptation der Zelle an verschieden Arten von Stress gewährleistet (40, 125, 139, 258). Für *B. subtilis* als Endosporenbildner würde man erwarten, dass er unter solchen extremen Bedingungen wie Hyperosmolarität Sporen bildet. Verschiedene Studien konnte jedoch zeigen, dass eine Inhibition der Sporulation unter hyperosmotischen Bedingungen sehr früh stattfindet (180, 277, 279). Dabei wird die

Spo0A- und σ^H -abhängige Transkription durch Salz inhibiert. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Interaktion von σ^H mit der RNA-Polymerase reduziert ist. Die Autoren vermuten, dass eine salzgestresste Zelle hohe Konzentrationen an Prolin als erste Antwort synthetisiert. Dadurch steht sie einer großen physiologischen Aufgabe gegenüber und verfügt nicht über die energetischen und biosynthetischen Ressourcen um der zeit- und energieaufwändigen Sporulation gewachsen zu sein (333). Neben der Sporulation haben hyperosmotische Bedingungen auch einen Einfluss auf den Keimungsprozess von *B. subtilis*. Durch eine erhöhte Salinität kommt es zu einer Inhibition der Keimungseffizienz, welche aber umkehrbar ist. Weiterhin verursachen hyperosmotische Bedingungen eine verlangsamte und heterogene Initiierung der Keimung. Im Gegensatz dazu konnte aber auch gezeigt werden, dass ein Teil der Sporenpopulation auch unter Salzstressbedingungen keimen kann, bei denen die vegetative Zelle nicht wachsen kann (89, 226).

Durch umweltbedingte Schwankungen der Osmolarität, wird Wasser entweder aus der Zelle raus oder in die Zelle rein transportiert, was den Zellturgor beeinflusst (32, 33). Während langer Trockenperioden überschreitet die Konzentration der gelösten Stoffe im extrazellulären Raum die der gelösten Ionen im Zytoplasma. Diese hypersalinen Bedingungen führen zu einem Wasserverlust der Zelle entlang des osmotischen Gradienten. Letztendlich kann dieser Wasserverlust zur Plasmolyse der Zelle führen (39, 261). Auf Grund der Diffusion von Wasser über die Lipiddoppelschicht, muss *B. subtilis* über ein aktives Wassermanagement verfügen, welches den Turgor in einem tolerierbaren Bereich hält. In allen drei Domänen des Lebens kommen sogenannte Aquaporine vor, die selektiv einen Wassertransport über die Zytoplasmamembran gewährleisten (306), jedoch kann kein Bakterium Wasser aktiv transportieren. Das Aquaporin AqpZ aus *Escherichia coli* dient als Modell für diese bakteriellen Wasserkanäle (54), es konnte jedoch kein verwandtes Protein in *B. subtilis* gefunden werden. Die Osmoregulation in *B. subtilis* erfolgt direkt im Zytoplasma über eine gerichtete Veränderung des osmotischen Potentials, welches dann einen Ein- oder Ausstrom von Wasser zur Folge hat (39).

2.1 Die „Salt out“ Strategie

Sobald Bakterien mit einem Anstieg der externen Osmolarität konfrontiert werden kommt es zu einem Efflux von Wasser, die Zelle dehydriert und letztendlich führt dies zur Plasmolyse. Um sich an diese hypersalinen Bedingungen anpassen zu können, haben Mikroorganismen zwei verschiedene Adaptationsmechanismen entwickelt. Diese werden als „Salt-in“ und „Salt-out“ Strategie bezeichnet (96).

Bei der sogenannten „Salt-in“ Strategie werden molare Konzentrationen an K^+ und Cl^- Ionen akkumuliert und zytotoxische Na^+ Ionen ausgeschleust. Dieser Anpassungsmechanismus ist zwar energetisch vorteilhafter, jedoch müssen Mikroorganismen ihre Physiologie und ihren Stoffwechsel an die hohen intrazellulären Ionenkonzentrationen angepasst haben. Auf Grund dessen wird die „Salt-in“ Strategie hauptsächlich in halophilen Bakterien gefunden (316), die in einer Umgebung kolonisieren in der permanent hohe Salzkonzentrationen vorhanden sind. Bei der „Salt-out“ Strategie werden zunächst ebenfalls K^+ Ionen akkumuliert, jedoch ist die Quintessenz dieser Strategie die Akkumulation von sogenannten kompatiblen Soluten (38, 39, 43). Kompatible Solute sind kleine, stark lösliche, organische Solute, die nicht mit den zellulären Prozessen interferieren und somit in hohen Konzentrationen akkumuliert werden können (261). Chemisch können die kompatiblen Solute in verschiedene Gruppen

eingeteilt werden, wobei Bakterien häufig Zucker oder Polyole (Trehalose, Glycerin), Aminosäuren (Glutamat, Prolin), Trimethyl-Ammonium-Verbindung (Glycin-Betain, Carnitin, Dimethylsulfoniopropionat), Sulfat-Ester (Cholin-O-Sulfat) sowie Tetrahydropyrimidine (Ectoin/ Hydroxy-Ectoin) verwenden (21, 39, 44, 164, 348). Kompatible Solute schützen nicht nur vor osmotischem Stress, sondern dienen auch als Kälte- und Hitzeschutz (21, 22, 133, 138). Des Weiteren fungieren kompatible Solute als Stabilisatoren für Proteine gegen den denaturierenden Effekt der hohen Ionenstärke. Dieser Mechanismus wird auch „präferentielle Exklusion“ genannt (304). Auf Grund der Protein-stabilisierenden Wirkung werden sie auch als chemische Chaperone bezeichnet (34, 88, 145).

B. subtilis ist ein Vertreter der „Salt out“ Strategie und wurde in dieser Hinsicht schon intensiv untersucht (Abb. 4). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die initiale Antwort auch bei *B. subtilis* die Akkumulation von K^+ Ionen ist, die über die Ktr-Systeme (KtrAB und KtrCD) erfolgt (137). Um umweltbedingte Informationen in der Zelle weiter verarbeiten zu können, sind viele Mikroorganismen in der Lage sekundäre Botenstoffe zu synthetisieren, hierbei spielen zyklische Mononukleotide (zyklisches AMP oder GMP), zyklische Dinukleotide (zyklisches di-AMP oder di-GTP), sowie (p)ppGpp eine Rolle. In *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass c-di-AMP ein essentielles Signalmolekül ist, da sowohl die Deletion, als auch die Überproduktion zu einer Beeinträchtigung des Wachstums führt (212). Vor kurzem konnte in *Staphylococcus aureus* gezeigt werden, dass c-di-AMP an KtrA, der zytoplasmatischen „Gating“ Komponente des Kaliumtransporters KtrAB, bindet und den Transport dadurch inhibiert (67). Interessanterweise konnte dies auch für die KtrA Untereinheit des *B. subtilis* KtrAB Transporters gezeigt werden (16, 67). Neben der direkten Regulation von KtrA mittels c-di-AMP, gibt es auch noch eine indirekte Regulation über den *ydaO* Riboswitch auf mRNA Ebene des *ktrA* Gens. c-di-AMP ist der primäre Ligand für den *ydaO* Riboswitch. Dieser *ydaO* Riboswitch ist präsent in der 5' UTR von *ktrAB*. Im Falle des Riboswitches führt die Bindung des Liganden c-di-AMP zu einer verfrühten Beendigung der Transkription (67, 229).

An die Aufnahmen von K^+ Ionen schließt direkt die Akkumulation von kompatiblen Soluten an. Als erste Antwort wird Prolin *de novo* aus dem Vorläufermolekül Glutamat über die Prolinsynthesegene *proHJ* und *proA* synthetisiert (41, 331), wobei dies zu einem Ausstrom des Kaliumpools führt. Dabei werden die Kaliumionen über Kaliumexporter (KhtSTU und YugO) exportiert (92, 265). Osmoprotektive Konzentrationen an Prolin können nicht nur durch dessen Synthese entstehen, sondern auch durch den Transport von Di- und Oligopeptiden, die Prolin beinhalten, welches durch Hydrolyse im Zytoplasma freigesetzt wird (348). *B. subtilis* ist aber auch in der Lage proteinogene und nicht- proteinogene Aminosäuren aufzunehmen, welche metabolisch in Prolin umgewandelt werden können und so die Zelle vor Osmostress schützen (347). Eine weitere Möglichkeit kompatible Solute zu akkumulieren ist der aktive Transport dieser Solute über spezifische Transporter. In *B. subtilis* existieren fünf Transportsysteme OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE (osmoprotectant uptake), die sich in ihrer Art und Substratspezifität unterscheiden (164). OpuA, OpuB und OpuC sind ABC Transporter und OpuD und OpuE sind sekundäre Aufnahmesysteme, die aus einer einzelnen Membrankomponente bestehen. Das prominenteste kompatible Solut in *B. subtilis* ist Glycin-Betain, welches über die Transporter OpuA, OpuC und OpuD aufgenommen werden kann (158, 159, 163) oder aus dem Vorläufermolekül Cholin synthetisiert werden kann (28, 159).

2003 wurde eine Transkriptomstudie von salzgestressten Zellen von Steil *et al.* durchgeführt, hierbei konnten 102 salzinduzierte Gene identifiziert werden (299). Unter anderem zeigten sich die Gene für die Synthese und den Transport von kompatiblen Soluten (*proHJ* und die Gene für den OpuA, OpuB und OpuC Transporter). Es konnten auch Gene identifiziert werden, die an der Zellwandsynthese oder -modifikation beteiligt sind. In 2012 konnte gezeigt werden, dass *B. subtilis* unter hochosmolaren Bedingungen seine Zellwand vorübergehend verändert und nicht mehr seine typische Stäbchenform besitzt, sondern gebogen ist und Ausstülpungen bildet (87).

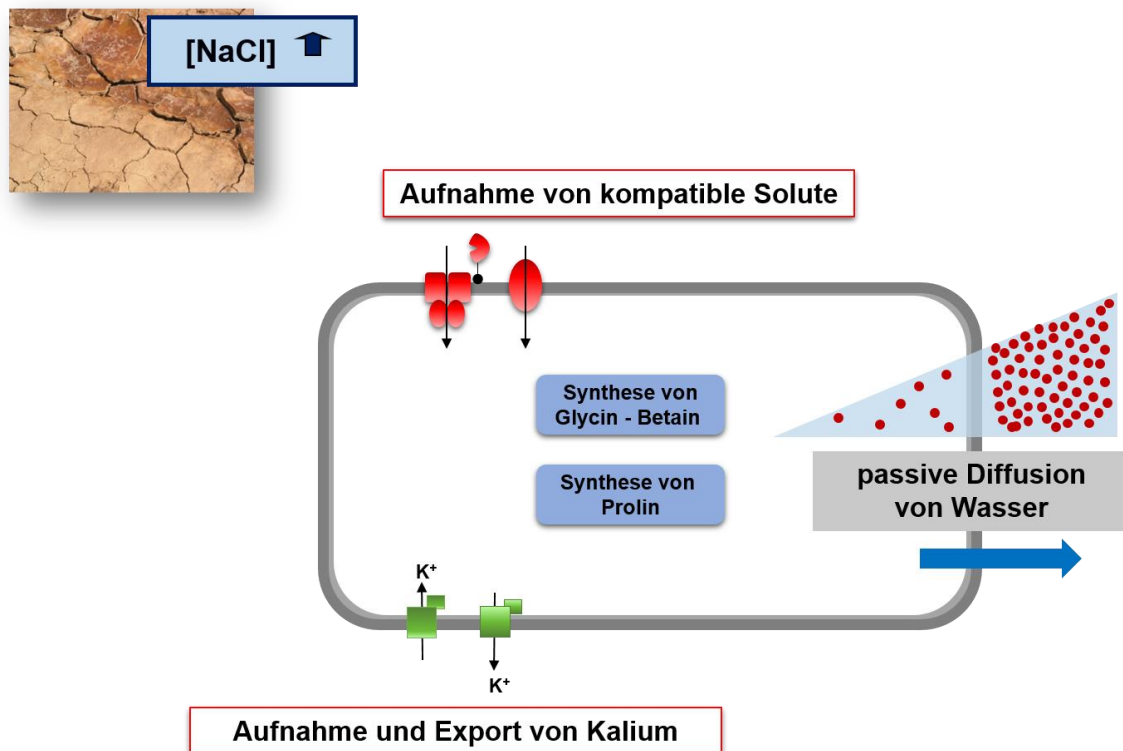


Abb. 4: Osmoregulation in *B. subtilis*

Dargestellt ist ein Überblick über die Salzstressantwort von *B. subtilis*, die auftritt, wenn das Habitat von *B. subtilis* austrocknet. Hochosmolare Bedingungen führen zu einer höheren Solutkonzentration (•) des extrazellulären Milieus, was einen Ausstrom von Wasser aus der Zelle zur Folge hat. Der Adaptationsprozess basiert auf der Akkumulation von K^+ Ionen sowie der Synthese von Prolin und dem Transport von kompatiblen Soluten. Modifiziert nach Pittelkow und Bremer (261).

In Bezug auf das Verständnis der Osmostressadaptation in *B. subtilis* fehlt jedoch noch eine wichtige Komponente und zwar der Sensor, der die Zelle dazu befähigt ein Signal aus der Umwelt wahrzunehmen und dann eine entsprechende Antwort zu initiieren. Die Erkennung eines spezifischen Signals und die Umsetzung in eine spezifische Transkriptions- oder Verhaltensantwort ist der wichtigste Teil der Signalweitergabe. Auf molekularer Ebene werden solchen Prozesse oft über Zwei-Komponenten Systeme bewerkstelligt.

3 Zwei-Komponenten Systeme

Adaptationen an verschiedene Umweltveränderungen werden primär durch verschiedene transkriptionelle Regulatoren vermittelt. Dabei spielen Serin-Threonin-Kinasen, ECF Sigmafaktoren und Zwei-Komponenten Signal Transduktionssysteme (TCS, engl.: Two component system) eine zentrale Rolle. Dieser Abschnitt behandelt die TCS in Bakterien, die eine entscheidende Rolle bei der Stressadaptation spielen. Eine Komponente des Zwei-Komponenten Systems besteht aus einer Histidinkinase, welche ein Signal aus der Umwelt oder dem Zytoplasma wahrnimmt und diesen Stimulus an die andere Komponente, den Antwortregulator weiterleitet. Dieser Regulator ist dadurch in der Lage eine spezifische Antwort auf den Stimulus zu geben, der in vielen Fällen eine transkriptionelle Veränderung zur Folge hat. TCS regulieren eine Reihe von physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel Sporulation, Kompetenz, Antibiotikaresistenz, den Übergang in die stationäre Phase, Virulenz und die Nutzung von Stickstoff, Phosphat und Kohlenstoff (104, 173).

3.1 Aufbau eines TCS

Die meisten TCS haben einen einfachen Aufbau und bestehen nur aus einer Histidinkinase und einem Antwortregulator (Abb. 5). Extrazelluläre, aber auch intrazelluläre Signale werden von der Histidinkinase wahrgenommen und verändern ihre Aktivität, indem sie eine Autophosphorylierung der Histidinkinase hervorrufen, welche daraufhin ein Dimer bildet. Die Autophosphorylierung erfolgt über eine ATP-abhängige Phosphorylierung eines konservierten Histidins von einem Histidinkinasenmonomer auf das zweite Monomer. Die Phosphatgruppe wird im nächsten Schritt auf ein konserviertes Aspartat des verwandten Antwortregulators transferiert. Die Phosphorylierung des Antwortregulators führt zu seiner Aktivierung und der darauf folgenden Antwort auf einen spezifischen Stimulus (301). Die Dephosphorylierung kann autokatalytisch, d. h. durch den Antwortregulator selbst, oder aber durch Phosphatasen erfolgen.

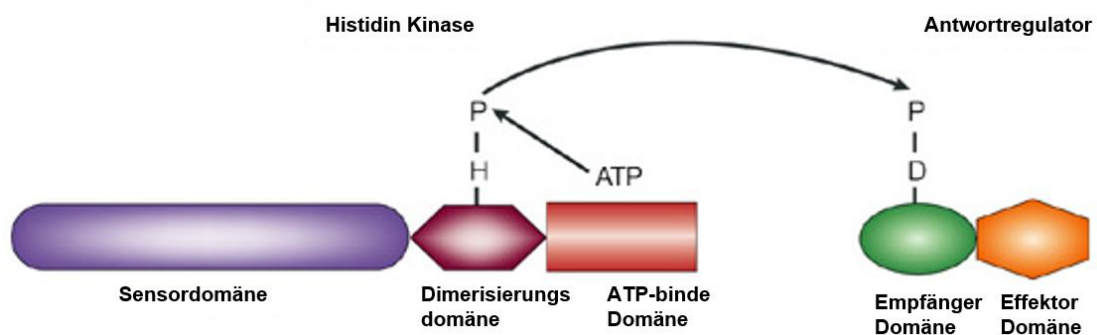


Abb. 5: Schematische Darstellung eines TCS

Abgebildet sind die verschiedenen Domänen der Sensorkinase und des Antwortregulators sowie die konservierten Aminosäuren die phosphoryliert werden (151).

3.1.1 Die Histidinkinase

Eine typische Histidinkinase ist ein membrangebundenes Homodimer, wobei jede Untereinheit zwei Transmembrandomänen besitzt, deren N-Termini im Zytoplasma lokalisieren. Orthodoxe Histidinkinasen

haben meistens 3 Domänen (Sensordomäne, Dimerisierungsdomäne und katalytische Domäne) die im Folgenden kurz erläutert werden. Die Sensordomäne einer Histidinkinase kann entweder im Zytosol, in der Membran oder extrazellulär lokalisiert sein und ist in ihrer Sequenz hochvariable. Die typische Histidinkinase besitzt ihre Sensordomäne außerhalb der Zelle und nimmt ein Signal aus ihrer Umgebung wahr. Im Gegensatz dazu können zytoplasmatisch lokalisierte Sensordomänen sogenannte PAS (**P**eriod circadian, **A**ryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, and **S**ingle-minded proteins) oder GAF (**c**AMP-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterases, **A**denylate cyclases, and the bacterial transcriptional regulator **F**hlA) Domänen besitzen (122, 208). Die Verbindung zwischen einer extrazellulären Sensordomäne beziehungsweise den Transmembrandomänen und der Dimerisierungsdomäne im Zytoplasma stellt die HAMP Domäne (**H**istidinkinase, **A**denylyl Zyklase, **M**ethyl akzeptierendes Chemotaxis Protein und **P**hosphatase), auch zytoplasmatischer Linker genannt, dar. Die Dimerisierung der Histidinkinase ist nötig für dessen Funktionalität und erfolgt über Dimerisierungsdomänen in den beiden Untereinheiten. Hier befindet sich in den meisten Fällen die sogenannte H-Box, die das absolut konservierte Histidin enthält, deshalb wird die Dimerisierungsdomäne auch häufig Phosphorylierungsdomäne oder Histidinkinasedomäne genannt. Die letzte Domäne ist die katalytische und ATP-bindende Domäne (301) und ist oft am C-terminalen Ende lokalisiert. Diese Domäne bindet ATP, welches dann ein Phosphat abgibt und auf das konservierte Histidin weiterleitet. In dieser Domäne gibt es 5 konservierte Sequenzen (N, G1, F, G2 und G3 Box), welche mit der H-Box die Marker für eine Histidinkinase ausmachen (254, 302). Einige Histidinkinasen besitzen zusätzlich noch eine Phosphataseaktivität um den korrespondierenden Antwortregulator zu dephosphorylieren (4, 162).

3.1.2 Der Antwortregulator

Der Antwortregulator besteht aus zwei Domänen, der N-terminalen Empfängerdomäne, welche konserviert ist und der C-terminalen Effektor-domäne, die auf Sequenzebene variabel ist. Dies zeigt, dass Antwortregulatoren diverse Output Funktionen haben können. Die meisten Antwortregulatoren sind Transkriptionsregulatoren, deren Effektor-domäne DNA-Bindemotive aufweist. Jedoch hat ein beträchtlicher Teil der Antwortregulatoren auch enzymatische Aktivitäten als Output. Weitere Output Möglichkeiten sind die Bindung von RNA, Liganden oder anderen Proteinen um zelluläre Prozesse auf einer post-transkriptionellen oder post-translationellen Ebene zu regulieren. Die Empfängerdomäne ist konserviert, sowohl auf Sequenzebene als auch auf struktureller Ebene. Dies lässt vermuten, dass es einen allgemeinen Signalmechanismus gibt, der den Stimulus von der Histidinkinase auf den verwandten Antwortregulator überträgt. Die Empfängerdomäne wird auch Phosphorylierungsdomäne oder Regulator-domäne genannt. In dieser Domäne befindet sich das stark konservierte Aspartat, welches das Phosphat von der Histidinkinase aufnimmt. Die Phosphorylierung des Aspartats führt zu einer Konformationsänderung (10, 195), welche auf die Effektor-domäne übertragen wird und diese somit aktiviert. Die Mehrheit der Antwortregulatoren in Bakterien besitzen eine DNA-Bindedomäne als Effektor-domäne und können durch diese in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden (97). Zu den drei größten Untergruppen gehört die Familie der OmpR/PhoB Gruppe, die ein typisches „winged helix-turn-helix“ Motiv aufweist. Die zweite Gruppe ist die NarL/FixJ Gruppe, die ein helix-turn-helix Motiv als DNA-Bindemotiv besitzt. Die letzte Gruppe ist die LytR/ArgA Gruppe, deren DNA-Bindedomäne hauptsächlich aus β -Strängen besteht.

3.2 Das DegS-DegU Zwei-Komponenten System aus *B. subtilis*

Um sich an Umweltschwankungen anzupassen hat *B. subtilis* verschiedene Adaptationsprozesse entwickelt, die unter anderem eine erhöhte Exoproteaseaktivität, genetische Kompetenz, erhöhte Beweglichkeit und die Sporulation sein können. All diese Prozesse werden von TCS kontrolliert. In *B. subtilis* konnten 36 Sensorkinasen und 34 Antwortregulatoren identifiziert werden, davon werden 32 der Kinase-Regulator Paare in einem Operon kodiert (83, 179). Interessanterweise gibt es unter diesen TCS ein System, das DegS-DegU TCS welches in die diversen Anpassungsprozesse (Exoprotease Produktion, Motilität und Kompetenz) involviert ist (6, 72, 74) und zusätzlich selber durch Salzstress induziert wird (299).

3.2.1 Aufbau und Mechanismus des DegS-DegU TCS

degS und *degU* wurden zuerst in Bezug auf ihre Regulation der degradativen Exoenzyme charakterisiert, da verschiedene Mutationen in beiden Genen entweder zu einem Defekt oder zu einer Überproduktion der Exoenzyme führt (126, 177, 300). Es konnte gezeigt werden, dass beide Gene in einem Operon kodiert werden (221) und DegS wurde als Histidinkinase und DegU als Antwortregulator des TCS identifiziert (71, 225). DegS wird an einem konservierten Histidin (His189) autophosphoryliert (71). Es konnte aber vor kurzem belegt werden, dass DegS auch an einem Serin (Ser76) durch zwei Hanks-Typ-Kinasen phosphoryliert werden kann. Diese zweite Phosphorylierung führt zu einer verbesserten Transphosphorylierung des Antwortregulators (152). Das Phosphat wird dann auf ein konserviertes Aspartat (Asp56) des Antwortregulators DegU übertragen (71, 309). Anhand seines typischen „helix-turn-helix“ Motivs wird DegU zur Klasse der NarL/FixJ Gruppe der Antwortregulatoren gezählt. Eine Besonderheit dieses TCS ist die Fähigkeit von DegS als Phosphatase zu agieren, sodass sie in der Lage ist den Antwortregulator zu dephosphorylieren und so seine Aktivität zu kontrollieren (72, 309). Des Weiteren ist DegS im Gegensatz zu anderen orthodoxen Histidinkinasen nicht in der Membran verankert, sondern zytoplasmatisch lokalisiert. In *B. subtilis* gibt es nur noch eine andere Histidinkinase (YhcY), die im Zytoplasma lokalisiert, dessen Funktion aber nicht bekannt ist (214). Während der Identifikation des DegS-DegU TCS wurden zwei Mutanten isoliert und charakterisiert. Beide zeigen einen identischen Phänotyp in Bezug auf eine erhöhte Exoproteaseaktivität, die Abwesenheit von Flagellen und auf die genetische Inkompetenz, haben jedoch verschiedene Genotypen. Zum einen wurde die DegU-Hypermutable [*degU32(Hy)*] charakterisiert, welche anstelle von Histidin an Position 12 ein Leucin trägt. Durch die Mutation wird die Halbwertszeit der Phosphorylierung von DegU~P von 20 Minuten auf 140 Minuten erhöht. Die andere Mutante trägt eine Mutation in *degS* [*degS200(Hy)*], welche eine Mutation in der Phosphatasedomäne (G218E) besitzt. Diese Mutation führt zu Inaktivierung der Phosphataseaktivität und somit auch zu einer erhöhten DegU~P Konzentration (71).

3.2.2 Regulation des DegS-DegU TCS

Auf transkriptioneller Ebene wird das *degSU* Operon durch drei Promotoren reguliert, einer (P1) liegt direkt vor *degS* und steuert die Transkription von *degS* und *degU*. Die anderen beiden Promotoren (P2 und P3) liegen vor *degU* und regulieren dessen Transkription (Abb. 6). Alle drei Promotoren wurden als σ^A -abhängige Promotoren identifiziert. Der *degU*_{P2} Promotor liegt im *degS* kodierenden Bereich und erhöht die Konzentration an DegU unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen über den

Transkriptionsfaktor TnrA (341). Im Gegensatz dazu reagieren die Promotoren vor *degS* und *degU*_{P3} auf Salzstress (299). Die Expression des *degSU* Operons wird zusätzlich noch durch den Transkriptionsregulator Spx positiv reguliert, welcher an den P1 Promotor bindet. Im Fall von P1 wird die Expression durch Glukose in einer Spx-abhängigen Weise reguliert, was eine neue und nicht identifizierte Rolle für Spx zeigt. Die Spx Aktivierung des P1 Promotors wird durch die Protease ClpXP negativ reguliert (290). DegS wird konstitutiv in einer geringen Menge transkribiert, sodass die intrazellulären Konzentrationen an DegU~P auch gering sind (221). Der P3 Promotor wird durch DegU~P positiv stimuliert, was zu einem positiven Feedback Loop des *degU* Promotors und einer Erhöhung der DegU~P Konzentration führt (239, 341). Ergänzend wird der P3 Promotor durch SinR, den Hauptbiofilmregulator, inhibiert (246). Eine weitere Regulation des P3 Promotors erfolgt über die direkte Bindung von CcpA, welches dessen Expression aktiviert (146). CcpA spielt eine Rolle in der Kohlenstoff Katabolitrepression (CCR, engl. carbon catabolite repression). Dabei handelt es sich um einen Mechanismus, der verhindert das bei Anwesenheit von Glukose alternative Kohlenstoffquelle aufgenommen werden können, in dem die entsprechenden katabolen Gene reprimiert werden. CcpA ist ein Transkriptionsfaktor der in der Katabolitrepression eine wichtige Rolle spielt und kann je nach Bindungsort aktivierend oder reprimierend wirken.

Auf Proteinebene wird das TCS zusätzlich durch verschiedene Mechanismen reguliert (Abb. 6), so zum Beispiel durch das RapG-PhrG System. Hierbei bindet RapG direkt an DegU~P und inhibiert dadurch seine DNA-Bindeaktivität. RapG wird in einem Operon mit PhrG kodiert, wobei letzteres RapG inhibiert. Hierfür wird PhrG zunächst als Prä-Pro-PhrG exprimiert und via dem Sec-abhängigen Weg nach außen sekretiert (Pro-PhrG). Nach der Prozessierung zu dem reifen Pentapeptid PhrG wird es über einen Oligopeptidtransporter (Opp) wieder ins Zytoplasma zurück transportiert und kann RapG inhibieren (236). RapG verhindert aber nicht nur die Bindung von DegU~P an Zielpromotoren, sondern auch von DegU an den *comK* Promotorbereich (236). Zwei Proteine, die die Phosphorylierung von DegU regulieren sind DegQ und DegR. DegQ ist ein 46 Aminosäure kleines Peptid, dessen Expression durch ComA reguliert wird, sodass es durch einer erhöhten Zelldichte angeschaltet wird (222). DegQ stabilisiert die Transphosphorylierung von DegS auf DegU, indem es die Autophosphorylierung von DegS stimuliert (78, 167). DegR ist ein 60 Aminosäure kleines Polypeptid, welches die Dephosphorylierung von DegU~P verhindert (224). Beide Proteine können jedoch deletiert werden und es zeigt sich kein Einfluss auf die Expression, der durch DegU~P regulierten Gene (224, 340). Hier ist zu erwähnen, dass DegQ durch eine Mutation im Promotorbereich (-10 Region invariantes T → C) im Laborstamm 168 nicht transkribiert wird (224). DegS interagiert mit dem SMC-ScpA-ScpB Komplex (dieser Komplex kontrolliert die DNA Verdichtung und Reparatur), dadurch wird die Kinaseaktivität von DegS inhibiert, sodass DegU nicht mehr phosphoryliert werden kann. Letztendlich wird die Aktivität von DegU~P auch durch geregelte Proteolyse eingestellt. Regulierte Proteolyse ist in *B. subtilis* nicht nur in der Stressantwort nötig, sondern auch in zellulären Differenzierungsprozessen (91, 150). In diesem Prozess spielen AAA+ Proteasen eine wichtige Rolle. In *B. subtilis* besteht eine Protease aus ClpP, der proteolytischen Untereinheit und regulatorischen ATPasen ClpX, ClpE oder ClpC (91). DegU~P wird durch ClpCP abgedaut, jedoch nicht das unphosphorylierte DegU Protein. Diese Regulation wird durch die CCR negativ beeinflusst. Glukose im Sporulationsmedium kann die Expression von *degU* induzieren, was zu einer Aktivierung von DegU~P regulierten Genen führt (*sacB* und *bpr*). Glukose reprimiert auch indirekt, durch CcpA Aktivierung, die

3.2.3 Prozesse, die durch den Antwortregulator DegU reguliert werden

Das DegS-DegU TCS reguliert verschiedene Prozesse in *B. subtilis*, die alle während oder nach dem Übergang von der exponentiellen Phase in die stationäre Phase stattfinden (Abb. 7). Dazu gehören die Regulation der genetischen Kompetenz, der Motilität, die Produktion von abbauenden Exoenzymen, der Poly- γ -glutamat Synthese und die Regulation der Biofilmbildung (72, 167, 178, 244). Interessanterweise werden diese Prozesse nicht nur von dem phosphorylierten DegU Protein reguliert, sondern auch von dem unphosphorylierten Protein. DegU agiert in beiden Konformationen als Transkriptionsfaktor. Für die beschriebenen Prozesse ist die Menge an DegU~P entscheidend, da geringe Konzentrationen an DegU~P nötig sind um die Motilität zu aktivieren, höhere beeinflussen die Biofilmbildung positiv und stark erhöhte Konzentrationen an DegU~P sind wichtig für die Exoproteaseproduktion. Unphosphoryliertes DegU aktiviert die genetische Kompetenz sowie die eDNA (extrazelluläre DNA) Produktion (317).

Bei der Analyse diverser Zielgene konnte gezeigt werden, dass DegU~P und DegU unterschiedliche Bindemotive aufweisen. So bindet DegU~P an direkte Sequenzwiederholungen, wohingegen DegU an inverse Sequenzwiederholungen bindet (240, 313). Beide binden aber an AT-reiche Oktamere. Dies konnte auch schon für andere NarL Regulatoren gezeigt werden (113, 202). Die Konsensussequenz ist aber eher degeneriert. Im Folgenden werden die verschiedenen Prozesse die durch DegU und durch DegU~P reguliert werden näher erläutert.

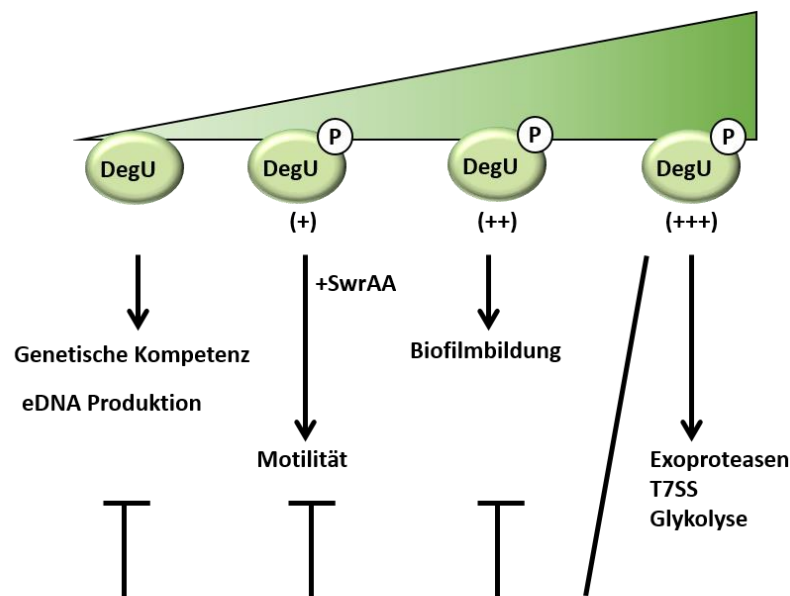


Abb. 7: Verschiedene Konzentrationen von DegU~P regulieren diverse Prozesse in *B. subtilis*

Gezeigt sind die multizellulären Prozesse die durch DegU reguliert werden. Dabei spielt die Konzentration an DegU~P eine wichtige Rolle. '+', '++' und '+++' stehen für sehr geringe, geringe und hohe Menge an phosphorylierten DegU. Eine Aktivierung wird durch Pfeile markiert und eine Repression durch T-Balken [modifiziert nach (317)].

Unphosphoryliertes DegU bindet an die Promotorregion von *comK*, welches für einen Transkriptionsfaktor der Kompetenzentwicklung kodiert. Durch die Bindung von DegU an *comK* wird ComK selber rekrutiert, um an seinen eigenen Promotor zu binden und so seine eigene Expression zu erhöhen. DegR wird durch

ComK reprimiert. Sobald DegU die ComK Menge erhöht, wird DegR, welches DegU~P stabilisiert, reprimiert. Schlussfolgernd können die Konzentration an DegU~P nicht steigen und die Kompetenz kann weiter ausgebildet werden (238). Eine weitere Rolle von DegU konnte vor kurzem in der eDNA Freisetzung gezeigt werden, da eine *degU* Transposonmutante nicht in der Lage ist eDNA freizusetzen (346).

Der Promotor vor dem *fla/che* Operon wird von DegU~P gebunden und dessen Transkription aktiviert, wenn DegU~P in geringen Mengen vorliegt (6, 313). Es konnte gezeigt werden, dass in Bezug auf das Schwimmen erhöhte Konzentrationen von DegU~P ohne die Bindung von SwrA eine reprimierende Wirkung haben (218). Erst durch die Bindung von SwrA hat DegU~P einen positiven Effekt auf die Motilität (313). SwrA interagiert hierbei mit der N-terminalen Domäne von DegU. Dies hat Auswirkungen auf die bereits erwähnte DegU-Hypermutante, da diese eine Mutation in der N-terminale Domäne besitzt was die Bindung von SwrA an DegU~P schwächt. SwrA selber wird auch durch DegU~P reguliert, indem DegU~P an den σ^A Promotor von *swrA* bindet und so dessen Transkription aktiviert. Ein weiteres Ziel von DegU~P ist die Aktivierung des Promotors von *flgM*, welcher die Expression des FlgM Anti-Sigmafaktors antreibt. FlgM verbindet die späte Flagellengenexpression direkt mit der Fertigstellung des Flagellums. FlgM verhindert das Flagellin exprimiert wird, bis das Flagellum soweit assembliert ist das Flagellin sekretiert und assembliert werden kann (142, 276). Ein weiteres Operon, welches die kooperative Aktivierung von DegU~P und SwrA benötigt ist das *pgs* Operon. Poly- γ -glutamat wird durch die Proteine PgsB, PgsC, PgsAA und PgsE synthetisiert, welche alle als Komplex in der Membran vorliegen. Die Regulation der Gene bedarf DegQ, SwrA und DegU~P. Poly- γ -glutamat dient als Nahrungsvorrat um Hunger zu vermeiden und als Barriere gegen Bacteriophagen oder andere phagozytische Attacken (56).

Eine Erhöhung der DegU~P Konzentration führt zur Aktivierung der Biofilmbildung, jedoch führen sehr hohe Mengen an DegU~P zu Inhibition der Biofilmbildung (205, 317). DegU~P aktiviert die Biofilmbildung indirekt in dem es die Expression von *bslA* aktiviert (132, 167, 248, 318). Unter zu Hilfenahme der DegU-Hypermutante konnte nachgewiesen werden, dass das *bslA* Gen bei hohen Konzentrationen an DegU~P aktiviert wird. Die *eps* und *tapA-sipW-tasA* Operons werden jedoch signifikant reduziert exprimiert. Diese Regulation ist indirekt, da ein Bandsift keine direkte Interaktion von DegU~P an den *epsA* oder *tapA* Promotorbereich zeigen konnte (205). Neben *bslA* wird *yvcA* auch durch DegU~P positiv reguliert (317). YvcA ist nötig für die Bildung der komplexen Koloniestruktur während der Biofilmbildung des Wildtyp *B. subtilis* Isolates 3610. Während der Reifung des Biofilms scheint die Konzentration an DegU~P anzusteigen, da die Exoproteaseaktivität sowie deren Transkription erhöht ist (204).

Sehr hohe Konzentrationen an DegU~P regulieren die Gene für eine Levansucrase (*sacB*), eine extrazelluläre alkaline Protease (*aprE*), eine neutrale Protease (*nprE*), eine α -Amylase (*amyE*), eine β -Glucanase (*licT-bglS*) und die Bacillopeptidase F (*bpr*) (13, 107, 223, 274, 288, 289, 312). Ein weiteres Ziel von DegU~P ist das *bacABCDEF* Operon, welches für ein Antibiotikum (Bacilysin) kodiert (167, 169). Außerdem inhibiert DegU~P *wapA*, welches für ein Zellwand-assoziiertes Protein kodiert (73). DegU~P hat einen direkten Einfluss auf die Katabolitrepression (CCR) in *B. subtilis*, da eine DegU-Hypermutante eine schnellere Reduktion von Fructose-bis-Phosphat (FBP) zeigt. Erhöhte FBP Mengen sind nötig um die HPR-Kinase zu aktivieren. Diese Kinase spielt eine entscheidende Rolle bei der CcpA-abhängigen CCR, da sie einen Komplex mit CcpA bildet und dieser Komplex an Zielgene binden kann. Letztendlich führt also ein schneller Abfall der FBP Menge zu einer verminderten CCR. Daraus wird geschlossen,

dass in einer DegU-Hypermutable die Glykolyse schneller abläuft, also Glukose effizienter verwertet werden kann (308).

Das neueste Ziel von DegU~P ist das „Esat-6-like“ Sekretionssystem (im weiteren Verlauf T7SS abgekürzt). Dieses Sekretionssystem wurde erst kürzlich in *Mycobacterium tuberculosis* entdeckt und wurde durch Homologievergleiche auch in anderen Actinobakterien und Firmicuten, wie *B. subtilis* gefunden (1). Dieses System sekretiert Proteine mit einem zentralen WXG-Motiv, welche aber sonst kein Sekretionssignal aufweisen. In Humanpathogenen spielt dieses System eine entscheidende Rolle in der Virulenz (1, 47). *B. subtilis* kodiert auch für ein T7SS (*yukE-yueD*), wobei YukE das sekretierte Protein ist. Für die Produktion und Sekretion von YukE werden hohe Konzentrationen an DegU~P benötigt (19). Bisher konnte dem T7SS in *B. subtilis* aber noch keine physiologische Rolle zugeordnet werden.

Vor kurzem konnte für DegU~P gezeigt werden, dass es die Expression des *yqiHIK* Operons aktiviert (86). Interessanterweise tauchen *yqiH* und *yqil* als zwei der am stärksten salzinduzierten Gene einer DNA-Makroarrayanalyse auf (299). Weitere Untersuchungen der durch Steil *et al.* identifizierten, salzinduzierten Gene (299) ergab, dass einige der abgeleiteten Proteine eine Rolle im Zellwandmetabolismus spielen. Dies führt zu der Hypothese, dass eine Modifikation der Zellwand unter hyperosmotischen Bedingungen stattfindet. Diese Vermutung konnte bereits durch vorherige Studien unterstützt werden. López *et al.* postulierte, dass Veränderungen der Zellwandkomposition unter hyperosmotischen Bedingungen in *B. subtilis* stattfinden und dabei die Dicke der Zellwand zunimmt und weniger kompakt ist (191, 192). Weiterhin konnte eine Veränderung in der Zytoplasmamembran beobachtet werden, da die Hydrophobizität der hyperosmotischen Kulturen zunahm und sich die Lipidkomposition veränderte. Neben der Anpassung über die kompatiblen Solute konnten Fischer und Bremer (87) zeigen, dass *B. subtilis* während des Anpassungsprozesses an hohe Osmolaritäten starke, aber nur vorübergehende morphologische Veränderungen im Phänotyp vornimmt. Nachdem die Zellen sich an die hohe Salzkonzentration adaptiert haben, bilden sich die morphologischen Veränderungen zur charakteristischen stäbchenförmigen Morphologie von *B. subtilis* zurück, es kommt aber auch zur Lyse der Zellen. Diese morphologischen Umgestaltungen setzen jedoch eine Restrukturierung der Zellwand voraus, welche durch zellwandmodifizierende Enzyme bewerkstelligt wird.

4 Die bakterielle Zellwand

4.1 Allgemeiner Aufbau der bakteriellen Zellwand

Bakterienzellen sind von einer kompakten Zellwand umgeben, die die membranumhüllte Zelle und den Protoplasten schützt und zugleich dem Zellturgor standhält. Bei der Visualisierung der Zellwand konnte zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Zellen ein erheblicher Unterschied festgestellt werden. So besitzen Gram-negative Bakterien eine Zellmembran, eine dünne Peptidoglykan Schicht (Zellwand) und eine äußere Membran. Diese äußere Membran ist in Gram-positiven Bakterien nicht vorhanden, jedoch besitzen sie eine sehr dicke Peptidoglykanschicht. Das Peptidoglykan, auch Mureinsacculus genannt, ist das stabilisierende Makromolekül. Dieses besteht aus linearen Glykansträngen, die über kurze Peptidketten quervernetzt sind, wodurch ein hoch flexibles Konstrukt entsteht, welches einer ständigen Neusynthese, Umstrukturierung und Abbau ausgesetzt ist. Der Glykanstrang besteht aus N-Acetyl-

Muraminsäure (MurNAc) sowie N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc), wobei an die Carboxyl-Gruppe der N-Acetyl-Muraminsäure die Peptidkette geknüpft ist (90). Die Glykanstränge zeigen unter verschiedenen Bakterien nur geringe Abweichungen, jedoch variiert die Peptidkette signifikant (282, 320). Zusätzlich besitzen Gram-positive Bakterien auch noch andere Polymere, die in der Zellwand verankert sind. Diese Polymere sind Teichon-, Lipoteichon- und Teichuronsäuren. Die Polymere machen einen erheblichen Anteil der Trockenmasse (bis zu 60%) der Zellwand von *B. subtilis* aus und sind für die negative Ladung der Zellwand verantwortlich. Neben den Polymeren sind an die Oberfläche der Gram-positiven Zellwand noch Proteine, sogenannte Lipoproteine, gebunden (291). Die dreidimensionale Anordnung der Zellwand ist immer noch unbekannt, jedoch gibt es drei Modelle, die die Anordnung beschreiben (77, 321, 322). Das neueste Model besagt, dass die Glykanstränge natürlicherweise rechtsgewunden sind, was zu einer helikalen Anordnung des Zellwandmaterials führt. Der Zellwandzylinder spiralisiert sich somit zu einer kabelartigen Architektur, mit einer gewundenen Substruktur (117, 215).

4.2 Synthese und Recycling der Zellwand

Die Synthese der Zellwand erfolgt in drei Stufen, die jeweils in verschiedenen Kompartimenten stattfinden. Im ersten Schritt werden die Peptidoglykanvorläufermoleküle (UDP-GlcNAc und UDP-MurNAc) im Zytoplasma synthetisiert und an einen Lipidtransporter gebunden. Im zweiten Schritt werden die lipidgebunden Intermediate (auch Lipid I und Lipid II genannt) an der Innenseite der Zytoplasmamembran generiert und Lipid II wird über eine Flippase an die äußere Oberfläche transloziert. Im letzten Schritt werden die einzelnen Zellwandkomponenten assembliert und in das bestehende Netzwerk mittels sogenannter Penicillin-Binde-Proteine eingebaut. Damit die Zelle wachsen und sich teilen kann, muss neues Material in die Zellwand eingebaut werden. Um neues Material einbauen zu können, müssen kovalente Bindungen im Mureinsacculus durch sogenannte Zellwandhydrolasen (Autolysine) gespalten werden. Jedoch entstehen dabei Lücken im Peptidoglykan, sodass die strukturelle Integrität in Gefahr ist. Hierbei gibt es zwei Hypothesen wie dieser Neueinbau von statten geht, ohne die Lyse der Zelle zu initiieren. Zum einen postulierte Weidel *et al.* ein Model bei dem Peptidoglykansynthasen und Zellwandhydrolasen in einem Gleichgewicht vorhanden sind, sodass die Autolysine Löcher in den Mureinsacculus schneiden und die Synthasen diese Löcher mit neuem Material wieder auffüllen (329). In dem sogenannten „inside to outside“ Modell wird postuliert, dass zunächst das neu synthetisierte nicht ausgedehnte Peptidoglykan mit dem bereits existierenden Mureinsacculus auf der Innenseite der Zellwand vernetzt wird. Das neue Peptidoglykan wird durch den Zellturgor gegen die Zellwand gedrückt und so als neue Schicht eingebaut (171). Der Abbau von altem Material durch Autolysine, der Einbau von neuem Peptidoglykan und die Abgabe von Muropeptiden in das umgebende Medium werden als Turnover bezeichnet (75). Es konnte gezeigt werden, dass Gram-positive Organismen bis zu 50% ihres Peptidoglykans abbauen und ins Medium abgeben (253), was zu einem massiven Verlust von Zellwandmaterial führen könnte. Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien, welche eine äußere Membran haben und so ihr abgebautes Peptidoglykan sichern können, haben Gram-positive Mikroorganismen keine äußere Membran und würden dadurch das abgebaute Material verlieren. In *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass das Peptidoglykan recycelt werden kann, welches die Wiederverwendung von Turnoverprodukten ermöglicht (136). In *E. coli* ist das Hauptabbauprodukt

GlcNAc-1,6-anhydroMurNAc-Peptid (Anhydromuropeptid), welches während des Zellwachstums aus dem Peptidoglykan durch lytische Transglykosylasen, Endopeptidasen und Carboxypeptidasen frei gelassen wird. Die Anhydromuropeptide werden dann über einen Sekundärtransporter (AmpG) aufgenommen und im Zytoplasma über verschiedene Enzyme weiter abgebaut. Daraus resultierende Produkte können wieder für die Mureinsynthese verwendet werden. Weiterhin konnte für *E. coli* gezeigt werden, dass die Aminosucker GlcNAc und MurNAc als Kohlenstoffquelle dienen können. Beide werden über ein spezifisches Phosphotransferasesystem aufgenommen [zusammengefasst in (267)].

4.2.1 Zellwand Recycling in *B. subtilis*

In *B. subtilis* konnten homologe Enzyme zu denen des Recyclingwegs in *E. coli* gefunden werden, jedoch fehlt das Aufnahmesystem AmpG. In Gram-positiven Mikroorganismen gibt es aber Lysozym-ähnliche Muramidasen, die MurNAc-beinhaltende Muropeptide freisetzen. Zudem gibt es GlcNAc-hydrolysierende Enzyme, die Peptidoglykan oder Muropeptide spalten und Amidasen und Carboxypeptidasen, die die Peptidkette des Peptidoglykans spalten. Diese abbauenden Enzyme werden weitestgehend sekretiert, sodass die daraus resultierenden Aminosucker und Peptide im Zellwandkompartiment entstehen. Dadurch ist kein Aufnahmesystem für Muropeptide nötig. Die Zucker können über ein spezifisches Phosphotransferasesystem (MurP) aufgenommen werden, wohin gegen die Peptide über einen Oligopeptidtransporter aufgenommen werden können. Das Gen *murP*, welches für das Phosphotransferasesystem kodiert, konnte in einem Operon mit fünf weiteren Genen lokalisiert werden (Abb. 8) (190). Die fünf weiteren Gene sind: *ybbI*, ein Ortholog der MurNAc-6-Phosphat Etherase (*murQ*), *ybbH*, ein Ortholog des MurNAc-6-Phosphat spezifischen transkriptionellen Repressors (*murR*) und *ybbD*, ein Ortholog der GlcNAc Hydrolase (*nagZ*). Weiterhin lokalisieren in diesem Cluster noch zwei putative Muropeptidasen (*amiE* und *ybbC*). Weitere Orthologe in *B. subtilis*, die im Zusammenhang mit dem Prozess des Recyclings stehen, sind eine L-Ala-D/L-Glu Epimerase (YkfB), YkfA eine L,D-Carboxypeptidase, YggT eine γ -D-Glu-*m*-DAP Amidase und NagP (GlcNAc Phosphotransferasesystem) (190, 253). NagZ, AmiE sowie YbbC besitzen eine Signalsequenz und agieren somit extrazellulär (190, 253). Verschiedene Genprodukte konnten näher charakterisiert werden und ein möglicher Recyclingweg wurde aufgedeckt (Abb. 8). Längere Peptidoglykanketten werden durch Amidasen aus dem Mureinsacculus herausgelöst. Durch bisher unbekannte Muramidasen (Mureinhydrolasen und Endopeptidasen) werden kürzere GlcNAc-MurNAc-Peptidfragmente (Muropeptid) abgebaut. Durch NagZ wird das GlcNAc von dem entstandenen Muropeptid abgespalten. In einem weiteren Schritt hydrolysiert AmiE die N-Acetylmuramyl-L-Alanin Verbindung des MurNAc-Peptids, sodass die Peptidkette und das MurNAc frei vorliegen. Die dadurch freigelassenen Zucker GlcNAc und MurNAc werden phosphoryliert und gleichzeitig über Phosphotransferasesysteme (NagP und MurP) ins Zytoplasma transportiert. Die entstandenen Peptide werden über Peptidtransporter in das Zytoplasma transferiert. Im Zytoplasma wird MurNAc-6-Phosphat über MurQ in GlcNAc-6-Phosphat umgesetzt, welches dann in der Mureinsynthese oder der Glykolyse verwendet werden kann.

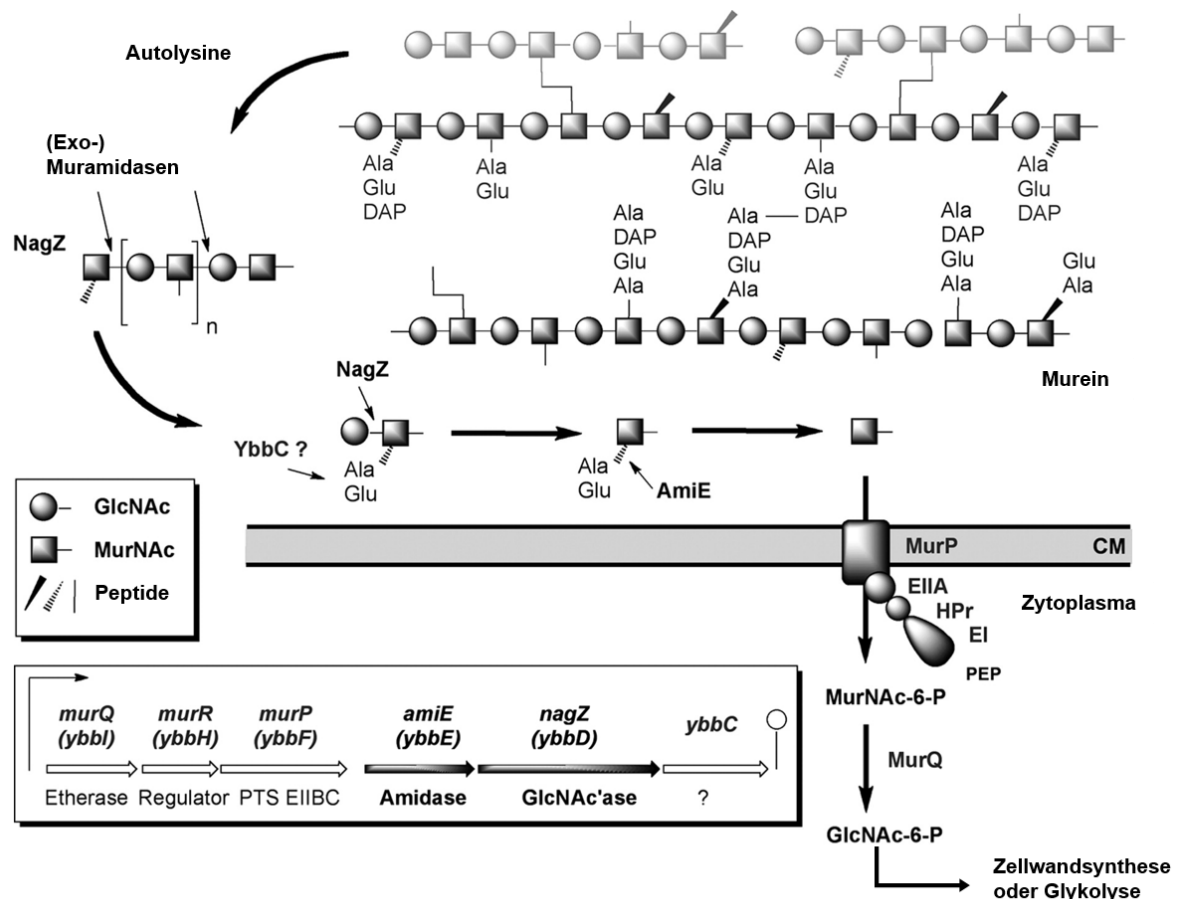


Abb. 8: Übersicht über den möglichen Recyclingweg von Muropeptiden in *B. subtilis*.

Während des Turnover werden ungefähr 50% der Zellwand freigesetzt, dabei entstehen Peptidoglykanstränge, die durch verschiedene Enzyme weiter in ihre einzelnen Bausteine abgebaut werden. Die entstehenden Peptide sowie Zucker (GlcNAc und MurNAc) können über Transporter in die Zelle aufgenommen werden. Dort werden sie weiter prozessiert, sodass sie in der Zellwandsynthese oder der Glykolyse wieder benutzt werden können. Das Operon, welches in *B. subtilis* bei dem Recycling von Zellwandmaterial involviert ist, ist eingezeichnet, CM, Zellmembran; EIIA und EI sind Enzyme die bei dem Transport von Zuckern eine Rolle spielen. PEP, Phosphoenolpyruvat; PTS, Phosphotransferasesystem; GlcNAc'ase, GlcNAc Hydrolase. Die Peptide L-Ala-γ-D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala sind mit Ala-Glu-DAP-Ala-Ala abgekürzt (190).

4.3 Autolysine

Während des Zellwachstums, des Zellwandturnovers, der Peptidoglykanreifung und der Zellteilung spielen Zellwandhydrolasen (Autolysine) eine wichtige Rolle. Autolysine werden auf Grund ihrer hydrolytischen Bindungsspezifität in vier Gruppen unterteilt: Muramidasen, Glucosaminidasen, Endopeptidasen und N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen (Abb. 9) (100).

N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen (Amidasen) hydrolysieren die Bindung zwischen MurNAc und L-Alanin. Die meisten Amidasen besitzen ein N-terminales Signalpeptid, wodurch eine Sekretion über die Membran gewährleistet wird. Carboxypeptidasen und Endopeptidasen spalten die Bindung zwischen den LD-, DL- und DD-Aminosäuren der Peptidstränge. Wobei Carboxypeptidasen den C-terminalen Teil hydrolysieren und Endopeptidasen im Peptidstrang angreifen (294). Eine weitere Gruppe der Autolysine sind die N-Acetyl-β-D-Muramidasen. Diese werden nochmal unterschieden in Lysozyme und lytische Transglykosylasen. Lysozyme hydrolysieren die Glykosidbindung, daraus resultiert ein Produkt mit einem N-terminalen MurNAc Anhang. Im Gegensatz dazu schneiden die lytischen Transglykosylasen die

Glykosidbindung, hierbei entsteht aber durch eine Nebenreaktion am MurNAc-Rest ein 1,6-Anhydroring. Die letzte Gruppe der Autolysine sind die N-Acetyl- β -D-Glucosaminidasen, die die glykosidische Bindung zwischen einem N-Acetyl- β -D-Glucosamin-Rest und dem benachbarten Monosaccharid spalten. Neben der katalytischen Domäne besitzen Autolysine noch eine weitere Domäne, welche für die Bindung des Proteins an die Zellwand verantwortlich ist. Die katalytische Domäne ist stark konserviert. Im Gegensatz dazu weisen die Zellwandbindedomänen eine erhöhte Diversität unter den Amidasen auf. Hierbei gibt es die Möglichkeit einer direkten Bindung an das Peptidoglykan, wobei mindestens sieben verschiedene Zellwandbindedomänen unterschieden werden. Autolysine können aber auch an sekundäre Zellwandpolymere (Lipoteichonsäuren) binden, dabei spielen „tandem repeats“ (14) eine Rolle [zusammengefasst in (322)]. Letztendlich besitzen die meisten Zellwand assoziierten Proteine einen hohen pI Wert, der die Affinität dieser Proteine zur negativ geladenen Zellwand ebenfalls erhöht (294).

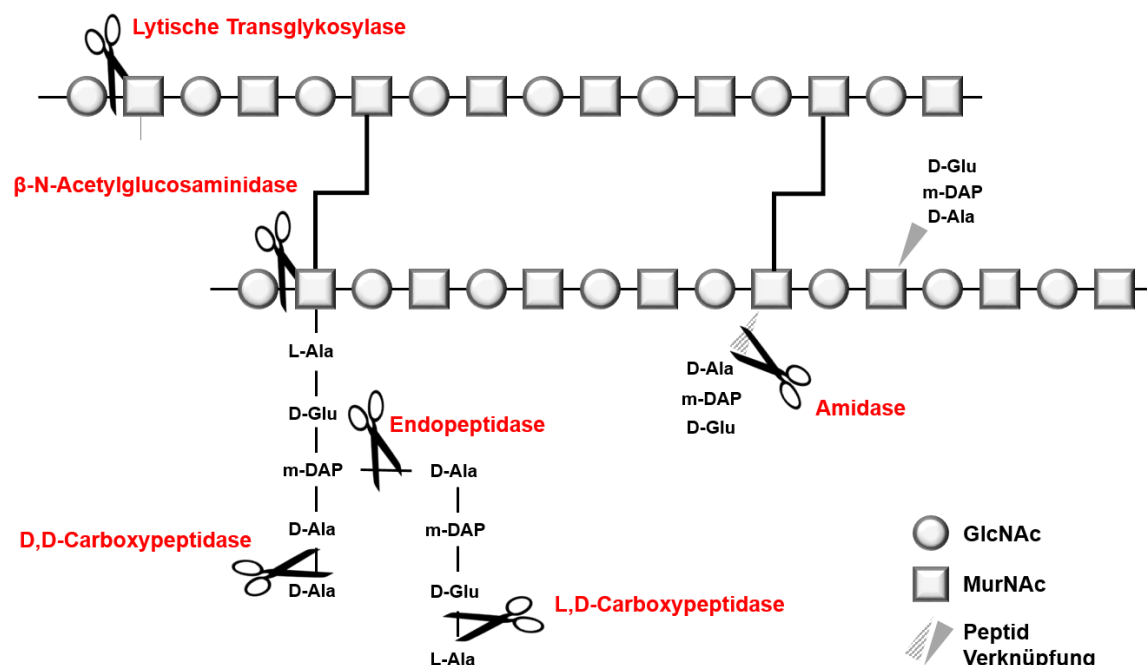


Abb. 9: Zellwandhydrolasen und ihre Zielbindungen

Die Scheren zeigen an, wo welches Autolysin (in rot) eine Bindung spaltet. Lytische Transglykosylasen und β -N-Acetylglucosaminidasen spalten die Zuckerketten. Endopeptidasen, Carboxypeptidasen und Amidasen spalten die Peptidketten im Peptidoglykan (190).

Auf Grund der letalen Fähigkeit dieser Enzyme ist eine exakte Regulation der Autolysine unabdingbar. Die Regulation kann auf transkriptioneller Ebene erfolgen, wie zum Beispiel im Fall der Autolysine die an der Sporulation beteiligt sind. Die Gene, die für Autolysine kodieren, werden durch die sporulationsspezifische Sigmafaktorkaskade reguliert. Dies hat zur Folge, dass diese nur dort exprimiert werden, wo die Enzyme letztlich auch benötigt werden. Auf der posttranslationalen Ebene können sie durch ihre subzelluläre Lokalisation reguliert werden, da eine Interaktion von Autolysinen mit dem Peptidoglykan die Aktivität beeinflusst. Dabei erfolgt die Translokation der Autolysine überwiegend über den Sec-abhängigen Weg, wobei in einigen Fällen ebenso die TAT-Translokationsmaschinerie verwendet wird (25). Die Aktivität der Autolysine kann aber auch direkt durch chemische oder

physikalische Veränderungen des Substrats reguliert werden. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass das Vorhandensein oder auch das Fehlen von sekundären Zellwandpolymeren die Aktivität von Autolysinen beeinflusst (128) wobei Lipoteichonsäuren eine inhibitorische Wirkung auf Zellwandhydrolasen haben können (320). Es ist jedoch schwierig einer Hydrolase eine spezifische Rolle zuzuweisen, da viele Bakterien mehrere Hydrolasen besitzen und es eine Redundanz unter den Autolysinen gibt. Außerdem ist es möglich, dass eine Hydrolase an mehr als einem Prozess im Bakterium beteiligt ist. Das *B. subtilis* Genom beinhaltet 35 Autolysine, welche in 11 Familien auf Grund der Aminosäuresequenz gruppiert werden können (294).

4.3.1 Das *yqiHIK* Operon

B. subtilis verändert unter Salzstress seine Zellwand, welche die Beteiligung von Autolysinen voraussetzt. Die Transkriptomstudie von salzgestressten Zellen zeigte, dass von den Autolysinen die N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase Yqil eine enorm erhöhte Expression unter hyperosmotischen Bedingungen aufweist (299). Auch in der Tiling-Array Studie von Nicholas *et al.* und in einer Transkriptomanalyse salzgestresster Zellen, die in einem Chemostat wuchsen, wurde *yqil* als eines der stärksten induzierten Gene identifiziert (172, 230). Auf Grund der beschriebenen Redundanz der Autolysine konnte bisher jedoch die exakte Rolle von Yqil während der Adaptation nicht nachgewiesen werden. So ist es möglich, dass es noch weitere Amidasen gibt, die hierbei eine Rolle spielen, aber auf Grund einer geringen Sequenzübereinstimmung zu bekannten Autolysinen nicht als Autolysine erfasst wurden sind.

yqil lokalisiert auf dem Chromosom in einem Gencluster mit *yqiH* und *yqiK*. Das *yqiHIK* Gencluster wird von einem Promotor vor *yqiH* transkribiert und hinter *yqiK* ist eine Terminatorsequenz zu finden. Durch ein „Operon Mapping“ konnte gezeigt werden, dass alle drei Gene eine Transkriptionseinheit bilden (Abb. 10 A). *yqiH* kodiert für ein putativ extrazelluläres Lipoprotein und *yqiK* für eine putative zytoplasmatische Glycerophosphodiester Phosphodiesterase (YqiK). Das Gen *yqil* besteht aus 618 bp, wobei das Prä-Protein aus 206 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Weiterhin besitzt Yqil ein N-terminales Signalpeptid, welches die Sekretion des Proteins über die Zytoplasmamembran ermöglicht (Abb. 10 B). Am C-terminalen Ende befindet sich die sogenannte katalytische Amidase_3 Domäne, welche charakteristisch für N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen ist. Dadurch ist Yqil in der Lage *in vitro* Peptidoglykan zu spalten (87).

Eine Gennachbarschaftsanalyse (<http://img.jgi.doe.gov>) zeigt, dass das *yqiHIK* Gencluster nur in drei weiteren nahe verwandten Organismen von *B. subtilis* vorkommt, nämlich *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atropeus* sowie *Bacillus licheniformis*. Sequenzhomologievergleiche (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf Nucleotidebene zeigen, dass die drei Gene nur in *B. subtilis* Unterarten vorkommen. Auf Proteinebene findet man alle drei Proteine in verschiedenen Arten der Gattung *Bacillus*.

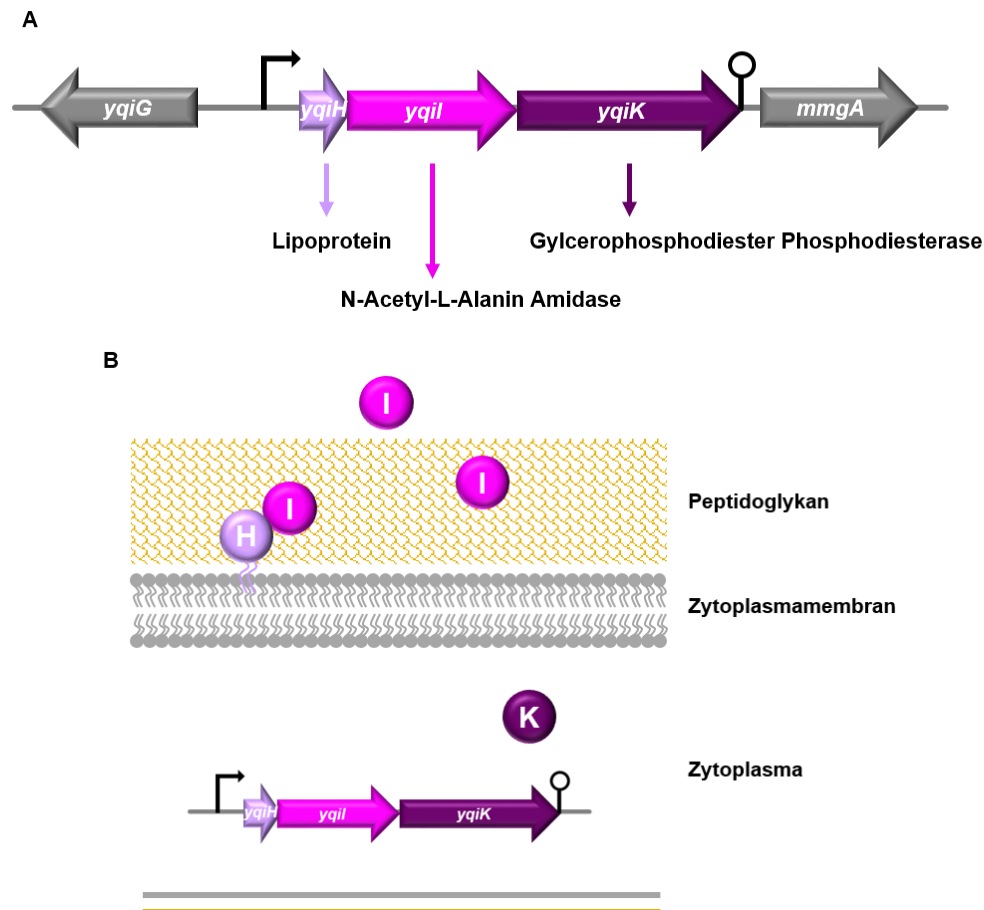


Abb. 10: Das *yqiHIK* Operon in *B. subtilis*

(A) Schematische Darstellung des *yqiHIK* Operons mit den putativen Funktionen der Gene. Der Promotor und Terminator sind eingezeichnet. Weiterhin sind das stromaufwärts gelegene Gen *yqiG* und das stromabwärts gelegene Gen *mmgA* dargestellt. (B) Mögliche Lokalisation von YqiH, in der Zytoplasmamembran verankert, Yqil, entweder kovalent an YqiH gebunden, am Peptidoglykan gebunden oder extrazellulär lokalisiert, und YqiK, im Zytoplasma.

Durch die detaillierte Analyse der Transkriptionsregulation des *yqiH* Promotors konnten verschiedene regulatorische Elemente identifiziert werden. Dabei wurde eine neue Antwort auf die Erhöhung der externen Salinität festgestellt. Es zeigte sich, dass eine Expression des *yqiHIK* Genclusters nur bei sehr hohen NaCl-Konzentrationen erfolgte ($> 0,7$ M NaCl). Die Expression wird dabei über einen SigA-abhängigen Promotor vermittelt (87). Weiterhin haben verschiedene kompatible Solute (Glycin-Betain, Cholin und Prolin-Betain) eine reprimierende Wirkung auf die *yqiHIK* Promotoraktivität unter hyperosmotischen Bedingungen (86). Sowohl der Biofilmregulator SinR, als auch der Hauptregulator Spo0A haben einen Einfluss auf die Expression von *yqiHIK*. Dabei bindet SinR vermutlich an zwei DNA-Regionen vor dem Transkriptionsstart und reprimiert die Promotoraktivität (86). Spo0A reprimiert unter hyperosmotischen Bedingungen die *yqiHIK* Expression (327). Außerdem wurde beobachtet, dass AbrB einen indirekten Effekt auf die Promotoraktivität hat, da durch die Deletion von *abrB* das *yqiHIK* Gencluster unter hyperosmotischen Bedingungen nicht mehr voll induziert wird. Letztendlich konnte für dieses Operon gezeigt werden, dass der Hauptregulator DegU~P einen positiven Einfluss auf die Expression von *yqiHIK* hat (86).

5 Ziel dieser Arbeit

In seinem natürlichen Habitat, den oberen Bodenschichten, ist *B. subtilis* zahlreichen Stressfaktoren ausgesetzt, diese bestehen unter anderem in der Verfügbarkeit von Wasser. Unter hyperosmotischen Bedingungen hat die Zelle verschiedene zelluläre Anpassungsstrategien um einen Wasserverlust zu vermeiden. Dabei spielen die Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten eine essentielle Rolle. Diverse Analysen des Transkriptomprofils salzgestresster *B. subtilis* Zellen zeigten, dass die Gene (*opuA* und *proH*) für die zellulären Anpassungsstrategien durch hyperosmotische Bedingungen hochreguliert werden (172, 230, 299).

Ein wichtiger Faktor bei der Adaptation an Salzstress ist der Sensor. Dieser nimmt extrazelluläre oder intrazelluläre Veränderungen, die durch hyperosmotische Bedingungen entstehen, wahr und leitet sie an die Zelle weiter, die mit einer spezifischen Antwort reagieren kann. Dieser sogenannte Salzsensor ist in *B. subtilis* bisher unbekannt, jedoch wurde die Sensorkinase DegS des DegS-DegU Zwei-Komponenten System oft mit dieser Rolle in Verbindung gebracht (278, 279). Die zytoplasmatische Lokalisation von DegS, sowie die osmotische Induzierbarkeit des DegS-DegU TCS spielen eine wichtige Rolle bei dieser Hypothese. Interessanterweise ist eine Vielzahl von Genen des DegU~P Regulons salzinduzierbar (197). Unter anderem taucht in den Transkriptomanalysen salzgestresster Zellen das Gen *yqil* als eines der stärksten salzinduzierten Gene auf. Dieses Gen wird in einem Operon mit *yqiH* und *yqiK* transkribiert. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der SigA-abhängige Promotor des Genclusters *yqiHIK* von DegU~P reguliert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine stromaufwärts gelegene AT-reiche Region wichtig für die osmotische Induktion des *yqiHIK* Operons ist (86).

Der Einfluss von DegS-DegU auf die Regulation des osmotisch induzierbaren *yqiHIK* Operons, sowie die zytoplasmatische Lokalisation der Sensorkinase DegS weisen auf ein experimentell gut zugängliches System hin, anhand dessen die osmotische Regulation salzinduzierter Gene in *B. subtilis* studiert werden kann. Dadurch sollen drei Aspekte analysiert werden. Zum einen soll das *yqiHIK* Operon an sich detaillierter analysiert werden. Ein Punkt hierbei spielt die stromaufwärts gelegene AT-reiche Region, der bisher noch keine exakte Funktion zugeordnet werden konnte. Weiterhin soll die Regulation von *yqiHIK* durch DegU~P detaillierter analysiert werden. Außerdem stellt die Lokalisation der Amidase Yqil einen zentralen Aspekt meiner Dissertation dar, da die Amidase zwar ein Signalpeptid besitzt, aber keine Zellwandbindedomäne, die typisch für Amidasen ist. Durch die Lokalisation der Amidase sollen physiologische Prozesse aufgedeckt werden, in die die Amidase involviert sein könnte.

Eine übergeordnete Frage, die im Laufe meiner Dissertation beantwortet werden soll, ist die nach der Rolle des DegS-DegU TCS während der Salzstressantwort und ob DegS die zentrale Salzstresssensorkinase ist.

IV Ergebnisse

1 Regulatorische und physiologische Analyse des DegS-DegU Zwei-Komponenten Systems

Das DegS-DegU Zwei-Komponenten System (TCS) spielt eine wichtige Rolle während des Übergangs von der exponentiellen zur stationären Phase. Dabei hat das System zum Beispiel Einfluss auf die Exoproteaseaktivität, die Kompetenz sowie auf die Motilität von *Bacillus subtilis* (6, 72, 237). Dem DegS-DegU TCS wurde aber nicht nur während dieser Prozesse eine Rolle zugesprochen, sondern verschiedene Gruppen stellten die Hypothese auf, dass das DegS-DegU TCS in die Salzstressadaptation involviert ist und DegS hierbei die Rolle des Salzsensors übernimmt (180, 278, 279). *B. subtilis* ist durch seine Halotoleranz in der Lage in Medium mit einer erhöhten Osmolarität zu wachsen. 1,2 M NaCl ist die maximale Salzkonzentration, bei der *B. subtilis* noch wachsen kann, die Lag-Phase sich jedoch durch diesen Stress verlängert (28). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Genen die von DegU~P abhängen, gleichzeitig auch durch erhöhte Salzkonzentrationen im Medium reguliert werden (180). Weiterhin wird die Expression von DegQ, welches einen Einfluss auf die Phosphorylierung von DegU hat, in hypertonen Medium hochreguliert (279). Eine weiterführende Studie wies darauf hin, dass die Deletion des DegS-DegU TCS zu einer verringerten Osmoresistenz von *B. subtilis* führt (278). Hierbei bezieht sich die Osmoresistenz auf Sporen von *B. subtilis*, da die Kulturen in Sporulationsmedium inkubiert und analysiert wurden. Eine Unterstützung dieser Hypothese war eine Transkriptomstudie salzgestresster Zellen, die dokumentierte, dass die Expression des DegS-DegU TCS durch eine erhöhte Osmolarität induziert wird (299) und dadurch das einzige TCS in *B. subtilis* ist, welches salzinduzierbar ist. Um die Rolle des DegS-DegU TCS unter hyperosmotischen Bedingungen zu analysieren, wurde zunächst die Expression des *degSU* Operons genauer analysiert.

1.1 Das *degSU* Operon ist osmotisch induzierbar

Um die salzabhängige Induktion des TCS zu analysieren wurden *degS* und *degU* Reporterfusionen konstruiert und unter verschiedenen Bedingungen getestet. Als Reportergen wurde *treA* genutzt, welches für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glukosidase (TreA) kodiert. Das Enzym ist in der Lage p-Nitrophenol- α -D-Glukopyranosid (pNPG) *in vitro* in einer kolorimetrischen Reaktion zu spalten. Durch eine photometrische Bestimmung des Farbproduktes kann man die TreA-Aktivität bestimmen, welche sich proportional zur Promotoraktivität verhält (103, 283). Für die Konstruktion der Reporterfusion wurde die Promotorregion der Zielgene vor das promotorlose *treA* Gen fusioniert. Das Fusionsprodukt wurde als Einzelkopie in den nicht essentiellen *amyE* Lokus in *B. subtilis* über homologe Rekombination inseriert. Hierbei wurden vier verschiedene genetische Hintergründe verwendet. Zum einen wurden alle Reportergenkonstrukte in den Wildtyp 168 inseriert. Um die Abhängigkeit der einzelnen Reportergenkonstrukte von dem DegS-DegU TCS zu analysieren wurden sie in einen Deletionsstamm ($\Delta degSU$) und in sogenannte Hypermутanten-Stämme eingebracht. Es existieren zwei Hypermутanten, die sich phänotypisch nicht unterscheiden, jedoch genotypisch einen Unterschied aufweisen. Hierbei differenziert man zwischen dem Stamm der eine *degU32*(Hy) Mutation (im Folgenden Text als DegU-Hypermутante bezeichnet) beinhaltet und dem Stamm der eine *degS200*(Hy) Mutation (Bezeichnung als DegS-Hypermутante im fortlaufenden Text) trägt. Die DegU-Hypermутante besitzt eine Mutation im N-

terminalen Bereich von *degU* (H12L) und die DegS-Hypermutable eine Mutation in der Phosphatasedomäne von *degS* (G218E). Beide Mutanten sind für eine erhöhte Exoproteaseaktivität, den Verlust von Flagellen und der genetischen Inkompetenz verantwortlich und zeigen eine verbesserte Phosphorylierung von DegU (72).

1.1.1 Reporteranalyse der Promotoren von *degS* und *degU*

degS und *degU* werden über drei Promotoren exprimiert (P1, P2 und P3). Die Promotoren sind in Abb. 11 A graphisch dargestellt. P1 ist für die Expression beider Gene zuständig und liegt vor dem Transkriptionsstart von *degS*. P2 und P3 sind für die Expression von *degU* verantwortlich, wobei P2 im kodierenden Bereich von *degS* liegt und P3 in der intergenen Region zwischen *degS* und *degU* (341). Alle drei Promotoren haben eine Konsensussequenz die zu einem SigA-abhängigen Promotor passt. Zu jedem der drei Promotoren wurde eine *treA* Fusion konstruiert, welche in die oben genannten vier genetischen Hintergründe eingebracht wurden.

Alle nachfolgenden Experimente mit *degS-treA* und die Northern Blot Analysen, sowie die Wachstumskurven wurden bereits von einer ehemaligen Doktorandin durchgeführt (110). Jedoch wurde dabei Helmann Minimalmedium mit der Zugabe von 5 μ M Eisen-III-Chlorid verwendet. Diese Menge an Eisen kann für *B. subtilis* zu gering sein, sodass er sein Fur-Regulon anschaltet (17). Um Nebeneffekte durch das Fur-Regulon zu vermeiden, wurden alle nachfolgenden Experimente wiederholt, die Menge an Eisen jedoch erhöht (250 μ M FeCl₃). Während der vorherigen Dissertation wurden außerdem Stämme verwendet, die die Deletion von $\Delta degSU$ sowie das *degU32*(Hy) Mutantenallel beinhalten, um die Wirkung von DegS-DegU auf bestimmte Zielgene zu zeigen. Ogura (240) konnte nachweisen, dass SwrA mit der N-terminalen Domäne von DegU interagiert und diese Interaktion wichtig für die Aktivierung einiger Zielgene ist, wie zum Beispiel des *fla/che* Operons (218). Die *degU32*(Hy) Mutation lokalisiert in der N-terminalen Domäne von *degU* und verhindert vermutlich die Interaktion von SwrA und DegU~P, sodass DegU~P sogar als Repressor für das *fla/che* Operon agiert. SwrA ist eines der Gene, welches im *B. subtilis* Wildtyp 168 mutiert ist und dazu führt, dass dieser keinen robusten Biofilm ausbilden kann. Die Mutation die zur Inaktivierung von SwrA führt ist eine Nukleotidinsertion, welche den Leserahmen unterbricht. Da aber nur ein einzelnes Nukleotid betroffen ist kann die Mutation mit einer Frequenz von 10^{-4} zurück mutieren, sodass in einer *B. subtilis* Population *swrA*⁻ und *swrA*⁺ Zellen vorkommen können (218). Um die Möglichkeit einer Unterbrechung der SwrA – DegU~P Interaktion zu umgehen, wurde zusätzlich ein Stamm genutzt, der das *degS200*(Hy) Mutantenallel beinhaltet. Dieses Hypermutablenallel befindet sich in dem *degS* kodierenden Bereich und führt zu einem Verlust der Phosphataseaktivität von DegS. Durch die *degS200*(Hy) Mutante werden also auch erhöhte Mengen an DegU~P erreicht, jedoch wird das DegU Protein an sich nicht verändert. Im Verlauf meiner Dissertation wurden daher beide Hypermutablen genutzt.

Für die *degS-treA* Fusion wurde ein 412 bp langes Fragment, welches den Promotorbereich stromaufwärts von *degS* und einen Teil des 5' kodierenden Bereiches von *degS* trägt, vor *treA* fusioniert und in den Wildtyp (THB41), den $\Delta degSU$ Deletionsstamm (THB21) und die DegU- und DegS-Hypermutablen (THB31, SLB214) eingebracht. Die Stämme wurden in Helmann Minimalmedium (HMM) mit und ohne 1,2 M NaCl kultiviert, in der exponentiellen Phase (OD₅₇₈ von $1,5 \pm 0,2$) geerntet und für

einen nachfolgenden TreA-Assay verwendet (Abb. 11 B). Dieses Experiment zeigt, dass der Promotor vor *degS* in jedem Hintergrund in der Tat um den Faktor 2 salzinduzierbar ist, jedoch nicht von der Konzentration von DegU~P (THB31 und SLB214) oder dem DegS-DegU TCS (THB21) an sich abhängig ist.

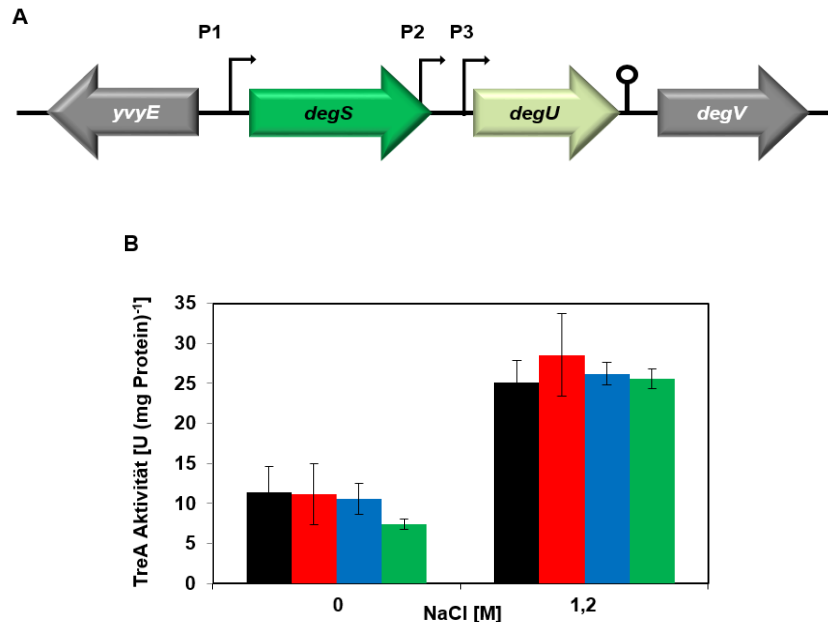


Abb. 11: Genetische Organisation des *degSU* Operons und Expression des *degS* Promotors

(A) Dargestellt ist die schematische Organisation des *degSU* Genclusters mit den angrenzenden Genen *yvyE* und *degV*. Die drei Promotoren, die für die Reporteranalyse genutzt wurden sind als gebogene Pfeile dargestellt und der Terminator ist gekennzeichnet. (B) Gezeigt ist die Promotoraktivität des *degS-treA* Wildtyp Fusion (THB41, schwarz), sowie der Fusionsstämme THB21 ($\Delta degSU$; rot), THB 31 [*degU32*(Hy), blau] und SLB214 [*degS200*(Hy), grün] die in HMM und in HMM + 1,2 M NaCl erfolgte. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

Für die Fusion des *degU_{P2}* und *degU_{P3}* Promotors wurde eine bereits existierende *treA* Fusion genommen, die beide Promotoren trägt (pTH17). Mittels gerichteter Mutagenese wurde die -10 Region des jeweiligen SigA-abhängigen Promotors mutiert, sodass dieser Promotor auf der *treA* Fusion inaktiv ist (siehe Material und Methoden Abschnitt 3.1.9). Dadurch konnten beide Promotoren einzeln analysiert werden. Für den *degU_{P2}* Promotor resultierten daraus folgende Stämme: SLB189 (Wildtyp), SLB190 ($\Delta degSU$), SLB191 (DegU-Hypermutable) und SLB213 (DegS-Hypermutable). Die Stämme SLB186 (Wildtyp), SB187 ($\Delta degSU$), SLB188 (DegU-Hypermutable) und SLB212 (DegS-Hypermutable) tragen das *treA* Gen an den *degU_{P3}* Promotor fusioniert. Auch diese Stämme wurden in HMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert, in der exponentiellen Phase geerntet und im TreA-Assay verwendet. Wie Abb. 12 A zu entnehmen ist, war der Promotor *degU_{P2}* unter den getesteten Bedingungen nur auf einem sehr geringen Transkriptionsniveau exprimiert, zeigte aber eine leichte Salzinduktion. Wie der Promotor vor *degS*, war auch *degU_{P2}* nicht von der Konzentration von DegU~P (SLB191 und SLB213) und dem DegS-DegU TCS (SLB190) an sich abhängig, da sich die Promotoraktivität nicht signifikant änderte.

Der Promotor direkt vor *degU* (*degU_{P3}*) war auch salzinduzierbar, war aber im Gegensatz zu den anderen beiden Promotoren abhängig von der Konzentration an DegU~P. Sowohl in der DegU-Hypermutable (SLB188), als auch in der DegS-Hypermutable (SLB212), konnte eine erhöhte Expression unter beiden Bedingungen detektiert werden. Wurde das TCS deletiert (SLB187) war keine Expression des Promotors

detektierbar, was eindeutig zeigte, dass das DegS-DegU TCS für die Expression des *degU_{P3}* Promotors nötig ist.

Vorläufige Northern Blot Ergebnisse mit einer *degS* und *degU* spezifischen Sonde konnten in der Tat die Reporteranalyse bestätigen. Der *degS_{P1}* Promotor und der *degU_{P3}* Promotor waren salzinduzierbar und nur der *degU_{P3}* Promotor war abhängig von dem DegS-DegU TCS und erhöhten DegU~P Mengen (Abb. 49).

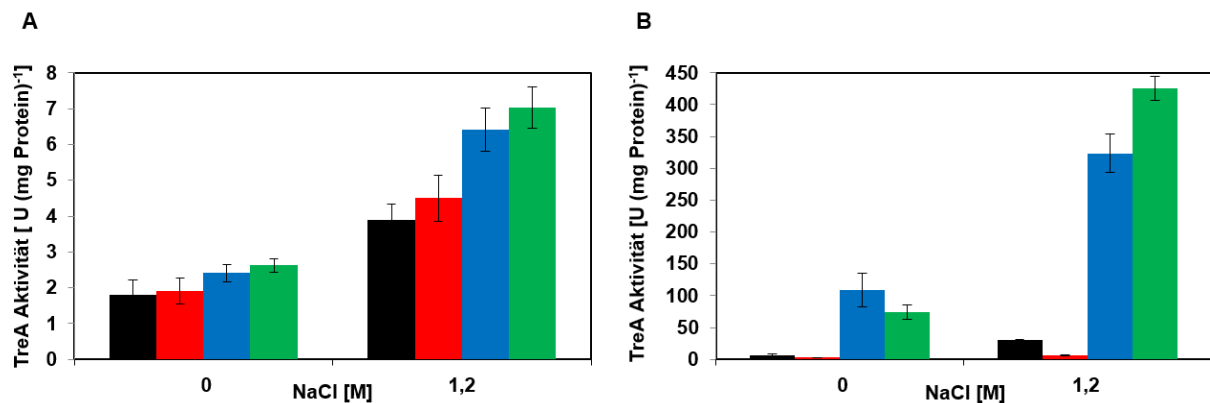


Abb. 12: Das Expressionsverhalten der *degU_{P2}* und *degU_{P3}* Promotoren in Abhängigkeit von Salz und dem DegS-DegU TCS

(A) Gezeigt ist die TreA-Aktivität der *degU_{P2}-treA* Fusion im Wildtyp (SLB189, schwarz), in der Deletionsmutante $\Delta degSU$ (SLB190, rot), in der DegU-Hypermutable (SLB191, blau) und DegS-Hypermutable (SLB213, grün). (B) Dargestellt ist die TreA-Aktivität der *degU_{P3}-treA* Fusion im Wildtyp (SLB186, schwarz), in der Deletionsmutante $\Delta degSU$ (SLB187, rot) und in den beiden Hypermutablen DegU (SLB188, blau) und DegS (SLB212, grün). Die Stämme wurden in HMM \pm 1,2 M NaCl inkubiert und in der exponentiellen Phase wurden Proben für den TreA-Aktivitätstest gezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

1.1.2 Eine graduelle Erhöhung des osmotischen Stresses steigert die Expression von *degS* und *degU_{P3}*

Um die Salzabhängigkeit des *degS* Promotors, sowie des *degU_{P3}* Promotors näher zu untersuchen, wurde die Expression der beiden korrespondierenden Reportergenkonstrukte in Minimalmedium mit linear ansteigenden NaCl-Konzentrationen getestet. Hierfür wurden THB41 und SLB186 in HMM mit verschiedenen Salinitäten (0 M NaCl – 1,2 M NaCl) inkubiert und Zellen in der exponentiellen Phase geerntet. Diese Proben wurden anschließend im TreA-Aktivitätsassay vermessen.

Das Ergebnis in Abb. 13 A zeigt, dass die Expression des *degS_{P1}* Promotors linear zur ansteigenden Salzkonzentration zunahm. Im Gegensatz dazu wurde der *degU_{P3}* Promotor zunächst auf einem Basalniveau von circa 12 Units exprimiert und erst ab einer NaCl-Konzentration von 0,7 M NaCl im Medium stieg die Expression von *degU_{P3}-treA* linear an. Dieses Expressionsmuster konnte bisher erst bei einem weiteren Operon (*yqiHIK*) von *B. subtilis* festgestellt werden (87).

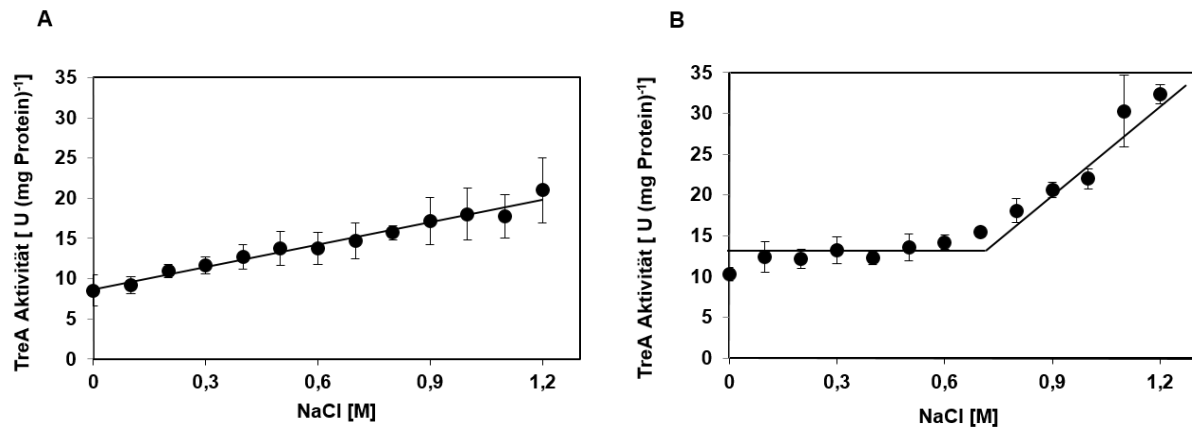


Abb. 13: Die Promotoraktivität von *degS* und *degU_{P3}* in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen

Gezeigt ist die Promotoraktivität der Stämme THB41 (A; *degS-treA*) und SLB186 (B; *degU_{P3}-treA*), die in Helmann Minimalmedium mit steigender Salzkonzentration (0 M NaCl – 1,2 M NaCl) kultiviert wurden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

Da für den *degU_{P3}* Promotor eine erhöhte Expression in den Hypermutanten im Medium mit und ohne 1,2 M NaCl festgestellt wurde, wurde im folgenden Experiment die Expression der *degU_{P3}-treA* Fusion in der DegS-Hypermutante (SLB212) mit ansteigenden Salzkonzentrationen getestet. Wie Abb. 14 entnommen werden kann, liegt im Wildtyphintergrund die *degU_{P3}* Promotoraktivität bis zu einer NaCl-Konzentration von 0,7 M auf einem Basalniveau vor (circa 12 Units). Erst wenn diese NaCl-Konzentration überschritten wurde, stieg die TreA-Aktivität an. Dabei stellte sich ein Höchstmaß der gemessenen TreA-Aktivität (ca. 35 Units) bei einer Salz-Konzentration von 1,2 M NaCl ein. Analysiert man das Expressionsverhalten von *degU_{P3}* nun in der DegS Hypermutante verändert sich dieses Muster komplett. So stieg die TreA-Aktivität zunächst proportional zur NaCl-Konzentration im Medium an. Ab einer NaCl-Konzentration von 0,8 M NaCl im Medium, erreichte die *degU_{P3}-treA* Fusion ein Limit von circa 450 Units, welches auch bei höheren Salzkonzentrationen nicht überschritten wurde.

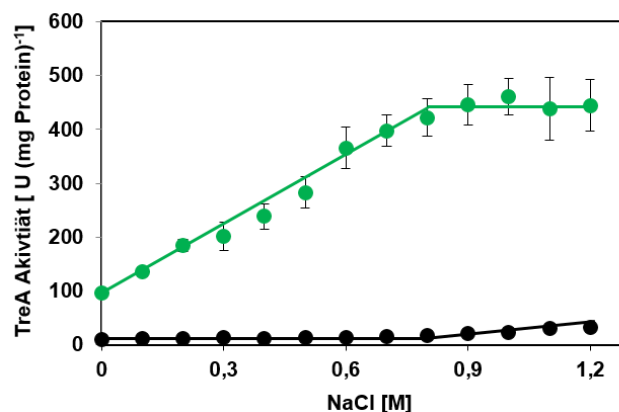


Abb. 14: Die Promotoraktivität von *degU_{P3}* in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen und von DegU~P

Gezeigt ist die Promotoraktivität der *degU_{P3}-treA* Fusion im Wildtyp (SLB186, schwarz) und der DegS-Hypermutante (SLB212, grün), die in Helmann Minimalmedium mit steigender Salzkonzentration kultiviert wurden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

1.1.3 Zucker erhöhen die osmotische Induktion des DegS-DegU TCS

Um zu analysieren, ob der Anstieg der Expression von *degS*, *degU_{P2}* und *degU_{P3}* spezifisch für eine hohe Salzkonzentration ist oder eine allgemeine Antwort auf einen osmotischen Stress ist, wurden noch andere osmotisch aktive Substanzen getestet. Für den Glycin-Betain Transporter *OpuA* konnte gezeigt werden, dass dieser durch einen Anstieg in der externen Osmolarität angeschaltet wird, unabhängig davon ob dieser Anstieg durch ionische (Salze) oder nicht ionische (Zucker) Substanzen verursacht wurde. Interessanterweise wurde die Expression stärker erhöht, wenn Zucker für den Anstieg in der externen Osmolarität verantwortlich sind. Dieses Phänomen konnte auch für das Prolinsyntheseoperon *proHJ* gezeigt werden (41, 134).

Um die Expression der drei Promotoren *degS*, *degU_{P2}* und *degU_{P3}* zu prüfen wurden die jeweiligen Reportergenkonstrukte im Wildtyphintergrund (THB41, SLB189, SLB186) in Helmann Minimalmedium mit der Zugabe der unterschiedlichen ionischen und nicht ionischen Substanzen kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet. Das Helmann Minimalmedium wurde mit den Substanzen Glycerin, NaCl, KCl, Saccharose und Laktose auf eine Osmolarität von circa 1000 mosmol (kg Wasser)⁻¹ eingestellt. Dies entspricht 0,4 M NaCl, 0,4 M KCl, 0,62 M Saccharose und 0,61 M Laktose. Glycerin dient in diesem Experiment als Kontrolle, da es keine osmotisch aktive Substanz ist. Um eine osmotische Induktion von Genen zu erhalten, muss ein osmotisch effektiver Gradient über die Zytoplasmamembran aufgebaut werden. Glycerin ist zwar in der Lage die Osmolarität des Mediums zu erhöhen, jedoch kann es auch die Zellmembran in hohen Konzentration frei durchdringen, sodass kein osmotischer Gradient aufgebaut wird.

Anhand von Tabelle 1 ist zu erkennen, dass in der Tat Glycerin nicht in der Lage war die Expression der getesteten Reportergenfusionen zu induzieren. Hierbei ist zu beachten, dass der Promotor *degU_{P3}*, wie oben beschrieben bei einer NaCl-Konzentration von 0,4 M NaCl nur auf einem Basalniveau exprimiert wird, sodass die Zugabe von KCl und NaCl in diesen Konzentrationen keinen großen Einfluss auf die Expression hatten. Im Gegensatz dazu hatten die Zucker Laktose und Saccharose einen drastischen Einfluss auf die Expression von *degU_{P3}*, als auch auf die Promotoren von *degS* und *degU_{P2}*. In allen drei Fällen schalteten die nicht ionischen Substanzen die Expression der Promotoren stärker an, im Vergleich zu den ionischen Stoffen NaCl und KCl. Dieses Expressionsverhalten konnte schon für andere Promotoren (*proH* und *opuA*) gezeigt werden, jedoch bisher ohne überzeugende Erklärung (41, 134).

Tabelle 1: Die osmotische Induzierbarkeit der drei Promotoren des DegS-DegU TCS durch ionische und nicht ionische Stoffe

Medium	Osmolarität [mosmol (kg Wasser) ⁻¹]	TreA-Aktivität [U (mg Protein) ⁻¹] ^a		
		<i>degS</i>	<i>degU_{P2}</i>	<i>degU_{P3}</i>
HMM	250	8 ± 1	2 ± 1	10 ± 1
HMM mit 0,68 M Glycerin	951	10 ± 1	3 ± 1	14 ± 7
HMM mit 0,4 M NaCl	1007	14 ± 1	2 ± 1	13 ± 1
HMM mit 0,4 M KCl	1009	16 ± 1	3 ± 1	12 ± 1
HMM mit 0,61 M Laktose	1335	39 ± 1	8 ± 1	89 ± 5
HMM mit 0,62 M Saccharose	932	26 ± 1	5 ± 1	46 ± 0

^a Die Zellen der *degS-treA* (THB41), *degU_{P2}-treA* (SLB189) und *degU_{P3}-treA* (SLB186) Fusion wurden bis zur exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 1,5 ± 0,2) in HMM oder in HMM mit einer erhöhten Osmolarität inkubiert. Die erhöhte Osmolarität wurde durch die Zugabe von verschiedenen ionischen und nicht ionischen Stoffen erreicht. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

1.2 Das *rapG-phrG* Operon ist osmotisch induzierbar

Nicht nur zwei Gene (*aprE* und *sacB*) die durch DegU~P reguliert werden sind salzinduziert (180). Die Expression von DegQ, welches die Autophosphorylierung von DegS stimuliert, wird durch Salzstress induziert (279). Ein weiteres regulatorisches Element von DegS-DegU stellt das RapG-PhrG System dar. RapG besitzt eine DNA-Bindedomäne und kann an DegU binden, sodass DegU nicht mehr an seine Zielpromotoren binden kann. Dadurch wird die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen inhibiert. PhrG ist in der Lage diese Inhibition aufzuheben indem es an RapG bindet, sodass dieses nicht mehr an DegU binden kann. Durch eine Deletion von *phrG*, wurde die Expression von *comK* (welches durch DegU aktiviert wird) sowie von *aprE* (Aktivierung durch DegU~P) reduziert.

1.2.1 Reporterogenanalyse der Promotoren von *rapG* und *phrG*

Um zu testen, ob neben DegQ auch dieses regulatorische System osmotisch induzierbar ist wurden für *rapG* und *phrG* Reportergenfusionen konstruiert. Im ersten Schritt wurden die Promotorbereiche der beiden Gene amplifiziert, vor das promotorlose *treA* Gen kloniert und in den *amyE* Lokus von *B. subtilis* über homologe Rekombination inseriert. Für *rapG* wurde ein 188 bp langes Fragment amplifiziert, welches sich aus einem 143 bp langen Fragment des Promotorbereichs und 43 bp des 5' kodierenden Bereiches von *rapG* zusammensetzt. Für *phrG* wurden zwei Konstrukte unterschiedlicher Länge angefertigt. Das längere Konstrukt ist 550 bp lang und trägt beide annotierten SigH-abhängigen Promotoren [Abb. 15 A (236)]. Das kürzere Konstrukt ist 379 bp lang und trägt nur den SigH-abhängigen Promotor direkt vor *phrG* (Abb. 15 A). Der Wildtyp 168 wurde mit den Fusionskonstrukten transformiert und daraus resultierten die Stämme SLB132, SLB135 und SLB299. Eine weitere Frage bestand darin ob es einen Regulationszyklus von DegU und RapG gibt, also ob das DegS-DegU TCS die Expression von *rapG-phrG* beeinflusst. Um dies zu testen wurden die Stämme SLB132, SLB135 und SLB299 mit der

DNA der *degSU* Deletionsmutante (die Stämme SLB133, SLB136 und SLB300 entstehen), der DegU-Hypermutable (die Stämme SLB134, SLB137 und SLB301 entstehen) und DegS-Hypermutable (die Stämme SLB205, SLB206 und SLB302 entstehen) transformiert. Alle Stämme wurden in HMM mit und ohne 1,2 M NaCl kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet. Diese Proben wurden anschließend zur Bestimmung der TreA-Aktivität eingesetzt.

Wie aus den Abb. 15 B-D zu entnehmen ist, wurden alle drei *treA*-Fusionen ohne Salz im Medium nur auf einem Basalniveau von maximal 20 Units exprimiert. Stieg die Salinität im Medium, erhöhte dies auch die Expression der *treA* Fusionen. Sowohl die lange *phrG-treA* Fusion (Abb. 15 C) als auch die kürzere Version (Abb. 15 D) zeigten unter hyperosmotischen Bedingungen eine Erhöhung der Expression um das 2,5-fache. Diese Salzinduktion verändert sich nicht in der Deletionsmutante (SLB136 und SLB300), sowie in der DegU- (SLB137 und SLB301) und DegS- (SLB206 und SLB302) Hypermutable. Die *rapG-treA* Fusion zeigt das gleiche Verhalten wie die *phrG-treA* Fusionen (Abb. 15 B). Im Wildtyp (SLB132) fand eine Salzinduktion mit dem Faktor 2 statt, jedoch war die Expression auf einem niedrigeren Transkriptionsniveau im Vergleich zu den *phrG-treA* Fusionen (SLB135 und SLB299). Auch zeigte sich keine Abhängigkeit von dem DegS-DegU TCS, da sowohl die Deletionsmutante (SLB133), wie die Hypermutable (SLB133 und SLB205) eine ähnliche Expression unter den beiden getesteten Bedingungen aufwiesen.

Vorangegangene Studien analysierten die Transkriptionseinheit von *rapG-phrG*, die als Operon identifiziert worden war (236). Neben der Expression als eine Transkriptionseinheit wird *phrG* durch zwei SigH-abhängige Promotoren exprimiert. Der Sigmafaktor SigH ist für die Regulation von Genen verantwortlich, die für die frühe Sporulation notwendig sind (42). Um die Operonstruktur zu bestätigen wurde ein Northern Blot durchgeführt. Außerdem sollte damit getestet werden, wie lang die beiden salzinduzierbaren Transkripte von *rapG* und *phrG* sind. Vorläufige Ergebnisse des Northern Blots zeigten, dass durch die *rapG* Sonde ein Transkript zwischen 1000 bp und 1500 bp detektiert werden konnte, welches nicht in der *rapG-phrG* Deletionsmutante detektierbar war (Abb. 50 B). Dieses Transkript könnte somit der gesamten *rapG-phrG* Transkriptionseinheit entsprechen. Vorläufige Ergebnisse mit der *phrG* Sonde zeigten zwei Fragmente, eins bei circa 1500 bp und das andere bei circa 400 bp (Abb. 50 C). Das kürzere und das längere Fragment zeigen eine klare Salzinduktion, jedoch war in der *degS200(Hy)* Mutante keine Salzinduktion feststellbar (Abb. 50 C). Das längere Fragment könnte dem gesamten *rapG-phrG* Genlokus entsprechen und das circa 400 bp Fragment dem *phrG* Transkript.

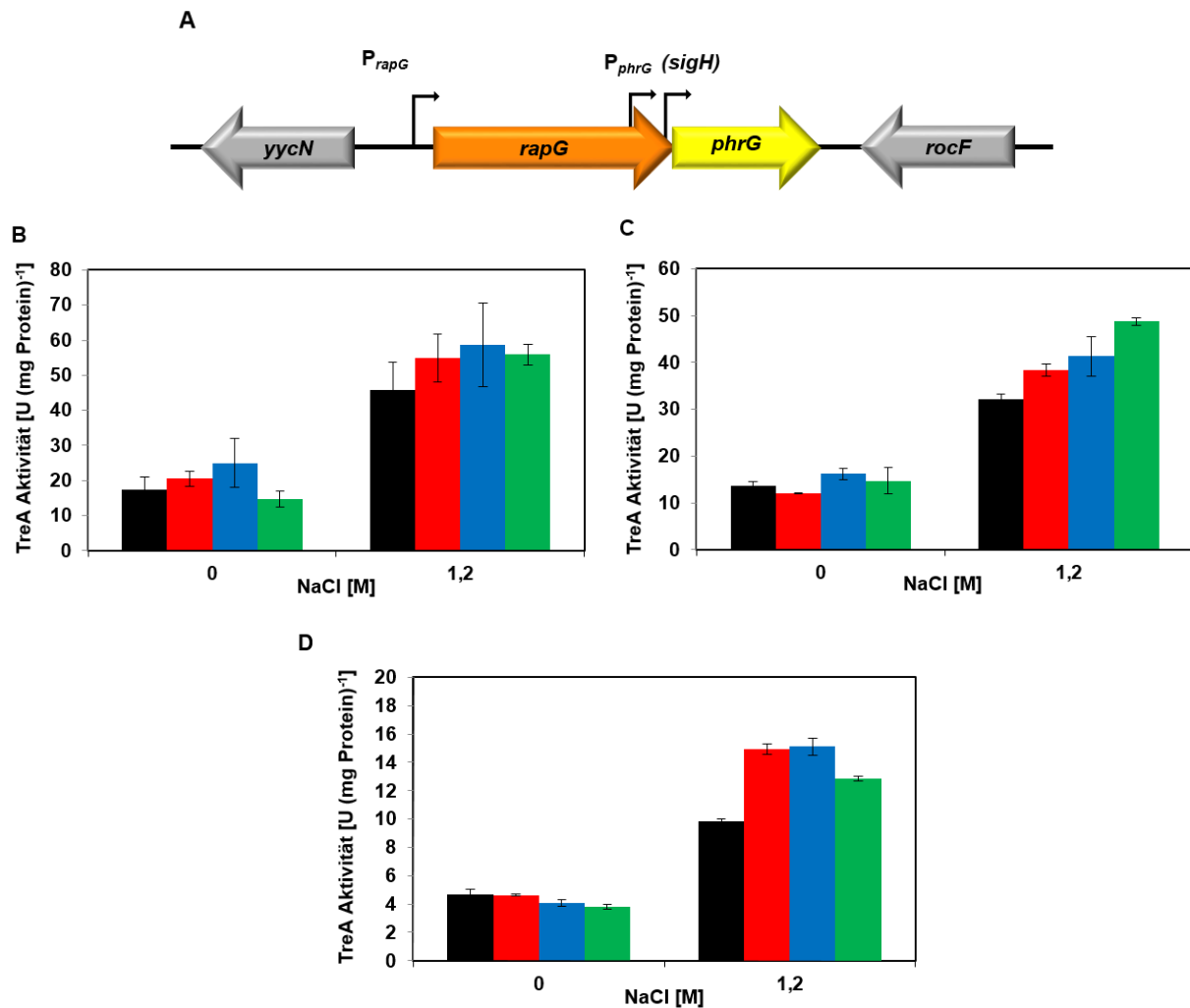


Abb. 15: Analyse der Promotoraktivität des *rapG-phrG* Systems

(A) Schematische Darstellung des *rapG-phrG* Operons, mit den bekannten Promotoren. (B) Bestimmung der Promotoraktivität der *rapG-treA* Fusion, (C) der langen *phrG-treA* Fusion die beide bekannte Promotoren abdeckt und (D) der kurzen *phrG-treA* Fusion. Schwarz steht für die *treA* Fusionen im Wildtyp (SLB132, SLB299, SLB131), rot für die Deletion des DegS-DegU TCS (SLB135, SLB300, SLB133), blau für die DegU-Hypermutable (SLB136, SLB301, SLB134) und grün für die DegS-Hypermutable (SLB206, SLB302, SLB205). Die Stämme wurden in HMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert, bei einer OD₅₇₈ von $1,5 \pm 0,2$ geerntet und anschließend im TreA-Enzymassay eingesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das regulatorische System RapG-PhrG salzinduzierbar ist, was für das regulatorische Protein DegQ ebenfalls nachgewiesen wurde (279).

1.3 Der Einfluss des DegS-DegU TCS auf das Wachstum von *B. subtilis* unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen

Frühere Analysen und die bisherigen Daten in dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass das DegS-DegU TCS in die Salzstressantwort von *B. subtilis* involviert ist (110, 279). Um den Einfluss von DegS-DegU auf die Physiologie von *B. subtilis* zu analysieren wurde das Wachstumsverhalten des Wildtyps (168), der Deletionsmutante (SLB40) und der beiden Hypermutablen SLB49 [*degU32*(Hy)] und SLB169

[*degS200(Hy)*] unter isoosmotischen sowie unter hyperosmotischen Bedingungen geprüft. Hierfür wurden die Stämme in Spizizen's Minimalmedium (SMM) mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und das Wachstum photometrisch über mehrere Stunden verfolgt (Abb. 16).

Unter ungestressten Bedingungen (gefüllte Kreise) gab es keinen Unterschied zwischen dem Wachstumsverhalten der Deletionsmutante (SLB40) im Vergleich zu dem Wildtyp (168). Jedoch zeigten beide Hypermuranten eine höhere maximale OD_{578} , sowie eine kürzere Lag-Phase im Vergleich zum Wildtyp. Für den Wildtyp 168 konnte eine Wachstumsrate von $0,54 \pm 0,04$ berechnet werden und für die Deletionsmutante $0,52 \pm 0,06$. Im Gegensatz dazu wurde für die DegU-Hypermurante eine Wachstumsrate von $0,83 \pm 0,03$ und für die DegS-Hypermurante $0,81 \pm 0,01$ berechnet. Unter hyperosmotischen Bedingungen (leere Kreise) zeigte sich, dass die Deletionsmutante SLB40 eine längere Lag-Phase als der Wildtyp 168 hatte, jedoch die Wachstumsraten nahezu identisch waren (Wildtyp $0,13 \pm 0,02$ und *degSU* Deletionsmutante $0,11 \pm 0,02$). Beide Stämme erreichten eine OD_{578} von 4, der Wildtyp nach 24 Stunden, der $\Delta degSU$ Stamm SLB40 nach 26 Stunden. Im Vergleich dazu waren die DegU- und DegS-Hypermuranten (SLB49 und SLB169) auch unter hyperosmotischen Bedingungen dazu in der Lage eine höhere OD_{578} zu erreichen (OD_{578} 6). Weiterhin betrug die Wachstumsrate etwa das Doppelte von der Wachstumsrate des Wildtyps (DegU-Hypermurante $0,21 \pm 0,02$; DegS-Hypermurante $0,25 \pm 0,02$).

Zusammenfassend zeigten die Wachstumsanalysen, dass der $\Delta degSU$ Deletionsstamm etwas länger brauchte um sich an die hohen Osmolaritäten zu adaptieren. Sobald die Zellen adaptiert waren, wuchs der Stamm genauso gut wie der Wildtyp. Die beiden Hypermuranten verschafften *B. subtilis* einen Wachstumsvorteil. Die DegU- und DegS-Hypermuranten wuchsen unter beiden Bedingungen schneller und erreichten eine höhere OD_{578} .

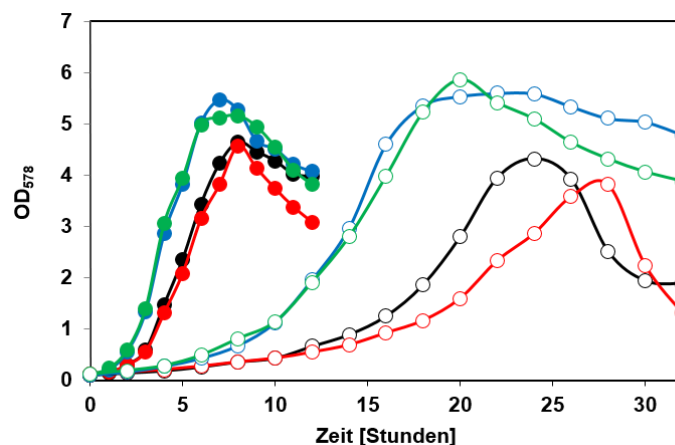


Abb. 16: Wachstumsanalyse der DegS-DegU TCS Mutanten unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen

Die Stämme Wildtyp 168 (schwarz), SLB40 ($\Delta degSU$, rot), SLB49 [*degU32(Hy)*, blau] und SLB169 [*degS200(Hy)*, grün] wurden in SMM mit (leere Kreise) und ohne (gefüllte Kreise) die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und das Wachstum photometrisch jede Stunde gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Wachstumsexperiment, dessen Daten in zwei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnten. Die Wachstumskurve wurde dreimal mit drei biologischen Parallelen reproduziert, dabei ergaben sich für die abgebildete Wachstumskurve folgende Wachstumsraten: Physiologische Bedingungen: μ (Wildtyp) $0,54 \pm 0,04$; μ (SLB40) $0,52 \pm 0,06$; μ (SLB49) $0,83 \pm 0,03$ und μ (SLB169) $0,81 \pm 0,01$. Hyperosmotische Bedingungen: μ (Wildtyp) $0,13 \pm 0,02$; μ (SLB40) $0,11 \pm 0,02$; μ (SLB49) $0,21 \pm 0,02$ und μ (SLB169) $0,25 \pm 0,02$.

1.4 Wechselwirkungen des DegS-DegU TCS mit kompatiblen Soluten

Auf Grund der Wachstumskurven stellt sich die Frage, ob die Hypermanten in der Lage sind mehr kompatible Solute anzureichern. Kompatible Solute wirken osmoprotektiv und tragen somit zu einer besseren Adaptation an osmotischen Stress bei, welches sich in einer Verbesserung des Wachstums widerspiegelt (21). Aus energetischen Gründen wird dabei die Aufnahme von kompatiblen Soluten, sofern diese extrazellulär vorhanden sind, der *de novo* Synthese vorgezogen. Die Akkumulation von kompatiblen Soluten kann also eine Rolle bei dem verbesserten Wachstum der Hypermanten spielen.

1.4.1 Glycin-Betain schützt die Mutanten des DegS-DegU TCS

Zunächst sollte getestet werden, ob die externe Zugabe von Glycin-Betain bei den Hypermanten zusätzlich, zu dem Wachstumsvorteil der Hypermanten an sich, noch eine Wachstumsverbesserung verursacht. Dafür wurden die Stämme Wildtyp 168, SLB40 ($\Delta degSU$), SLB49 [$degU32(Hy)$] und SLB169 [$degS200(Hy)$] in SMM Medium mit und ohne 1,2 M NaCl sowie mit der Zugabe von 1 mM Glycin-Betain inkubiert und das Wachstumsverhalten wurde photometrisch festgehalten (Abb. 17 und Abb. 51).

Die Zugabe von Glycin-Betain führte unter isotonischen Bedingungen zu keinem Wachstumsvorteil der einzelnen Stämme (Abb. 51). Unter hyperosmotischen Bedingungen verbesserte sich das Wachstum der Deletionsmutante SLB40 soweit, dass er ähnlich wie der Wildtyp 168 wuchs und die Lag-Phase beider Stämme sich verkürzte. Die Hypermanten erfuhren durch die Zugabe von Glycin-Betain auch einen Wachstumsvorteil, so erreichten sie ihre maximale OD_{578} nach 12 Stunden (ohne Glycin-Betain nach 20 Stunden). Jedoch war die maximale OD_{578} von 4,5, aus bisher unbekannten Gründen, weit geringer als die der Kulturen ohne Glycin-Betain (OD_{578} 6).

Es war also möglich die Mutanten des DegS-DegU TCS mit Glycin-Betain vor hyperosmotischem Stress zu protektieren.

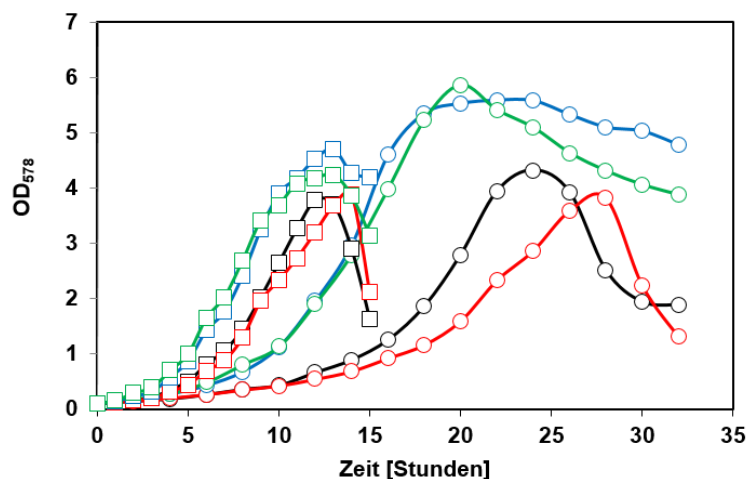


Abb. 17: Wachstumsanalyse der DegS-DegU TCS Mutanten unter hyperosmotischen Bedingungen mit und ohne die Zugabe von Glycin-Betain

Die Stämme Wildtyp 168 (schwarz), SLB40 ($\Delta degSU$, rot), SLB49 [$degU32(Hy)$, blau] und SLB169 [$degS200(Hy)$, grün] wurden in SMM mit 1,2 M NaCl (leere Kreise) und der Zugabe von 1 mM Glycin-Betain (leere Quadrate) kultiviert und das Wachstum photometrisch jede Stunde gemessen. Die Wachstumskurve wurde zweimal mit zwei biologischen reproduziert, dabei ist hier eine der beiden Wachstumskurven abgebildet.

1.4.2 DegU~P rettet nicht den Wachstumsdefekt der *proHJ* Deletionsmutante

Ein weiteres kompatibles Solut, das *B. subtilis* nutzt ist Prolin, welches dessen einziges *de novo* synthetisiertes kompatibles Solut ist (41, 331). Eine Deletion des osmotisch induzierbaren *proHJ* Operons, welches für die Proteine der Prolinsynthese kodiert, zeigte, dass dieser Deletionsstamm unter hyperosmotischen Bedingungen kaum noch wachsen kann (41, 331). Auf Grund des verbesserten Wachstums der Hypermanten sollte nun getestet werden, ob diese in der Lage sind das verminderte Wachstum der $\Delta proHJ$ Mutante zu retten. Dafür wurde der *proHJ* Deletionsstamm (TMB5) mit den verschiedenen DegS-DegU Mutanten kombiniert und das Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen nach 16, 20 und 24 Stunden photometrisch bestimmt.

In dem Punktwachstums-Experiment (Abb. 18) war zu erkennen, dass die $\Delta degSU$ Mutante SLB40 im Vergleich zum Wildtyp 168 langsamer wuchs, da sie erst nach 24 Stunden dieselbe OD₅₇₈ erreichte, die der Wildtyp schon nach 20 Stunden erreicht hatte. Weiterhin zeigten die Hypermanten SLB49 und SLB169 auch ein verbessertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp 168. Diese Ergebnisse bestätigte die Wachstumskurve. Es war eindeutig zu erkennen, dass die Hypermanten, trotz ihres besseren Wachstums, nicht in der Lage waren den salzsensitiven Phänotyp der *proHJ* Deletionsmutante zu kompensieren. Alle Kombinationen der $\Delta proHJ$ Mutante mit dem Wildtyp (TMB5), der Deletionsmutante (SLB261) und der DegU-Hypermante (SLB99) und DegS-Hypermante (SLB262) schafften auch nach 24 Stunden Wachstum unter hyperosmolaren Bedingungen nur eine OD₅₇₈ von 0,5.

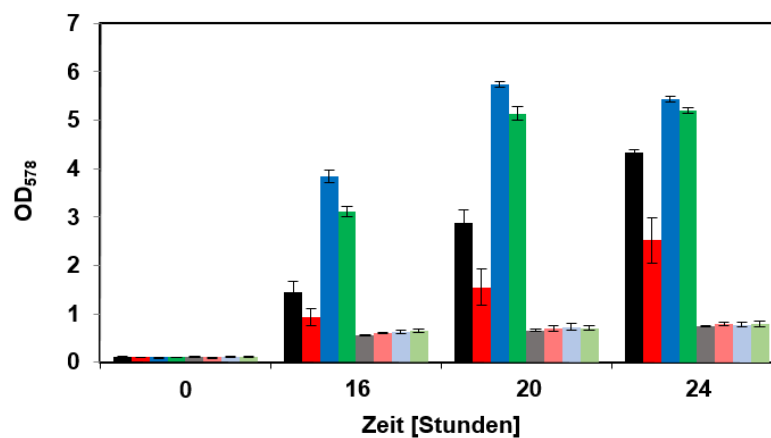


Abb. 18: Wachstumsanalyse der $\Delta proHJ$ Mutante in verschiedenen DegS-DegU TCS Mutanten

Abgebildet ist das Wachstum des Wildtyps 168 (schwarz), der $\Delta degSU$ Mutante SLB40 (rot), der DegU-Hypermante SLB49 (blau) und der DegS-Hypermante SLB169 (grün), sowie dieser Stämme mit der Deletion von *proHJ* [TMB5 ($\Delta proHJ$, grau), SLB261 ($\Delta proHJ, \Delta degSU$; hellrot), SLB99 [$\Delta proHJ, degU32(Hy)$; hellblau] und SLB262 [$\Delta proHJ, degS200(Hy)$; hellgrün]. Die Zellen wurden in SMM mit der Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und die OD₅₇₈ nach 16, 20 und 24 Stunden photometrisch festgehalten. Die Wachstumsanalyse wurde zweimal mit zwei biologischen reproduziert, dabei ist hier repräsentativ eine Wachstumsanalyse abgebildet.

1.4.3 Der Einfluss des DegS-DegU TCS auf die Akkumulation von Prolin

Da Glycin-Betain immer noch eine protektive Wirkung auf das Wachstumsverhalten der DegS-DegU TCS Mutanten hat und die Hypermutanten nicht den salzsensitiven Phänotyp der *proHJ* Deletionsmutante retten kann, stellte sich eine Frage: Hat das DegS-DegU TCS einen Einfluss auf die *de novo* Synthese von Prolin? Um diesen Einfluss nachzuweisen wurde der intrazelluläre Prolingehalt mittels der von Bates *et al.* beschriebenen Methode (im weiteren Verlauf als Bates-Test betitelt) bestimmt [Material und Methoden 5.4; (23)]. Hierfür wurden die Stämme Wildtyp 168, SLB40 ($\Delta degSU$), SLB49 (DegU-Hypermutante) und SLB169 (DegS-Hypermutante) in SMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und bei einer OD₅₇₈ von 2 ($\pm 0,2$) geerntet und dann in den Bates-Test eingesetzt. Dieser Test beruht auf einem kolorimetrischen Nachweis, bei dem Ninhydrin einen roten Farbkomplex mit Prolin bildet. Diese Rotfärbung kann photometrisch bestimmt werden und ist zurück rechenbar auf die Menge an Prolin in der Zelle.

In Abb. 19 A ist zu erkennen, dass die Hypermutanten unter isotonischen Bedingungen den Prolingehalt in der Zelle nicht erhöhten, obwohl eine eindeutige Verbesserung des Wachstums der beiden Stämme SLB49 und SLB169 festgestellt werden konnte. Alle getesteten Stämme akkumulierten circa 10mM Prolin unter isoosmotischen Bedingungen (0 M NaCl). Unter hyperosmotischen Bedingungen war ein Unterschied zwischen der Deletionsmutante (SLB40) und der DegU-Hypermutante (SLB49) im Vergleich zu dem Wildtyp 168 zu erkennen. Die DegS-Hypermutante hingegen akkumulierte nicht mehr Prolin als der Wildtyp. Die Analyse der Überstände in Hinblick auf die Prolinkonzentration zeigte, dass kein Prolin im Überstand vorhanden war (Abb. 52).

Auf Grund dieses Ergebnisses wurde geprüft, ob das DegS-DegU TCS einen Einfluss auf die Transkription des *proHJ* Genclusters hat. Hierfür wurde der *proH-treA* Fusionsstamm (SLB253) mit der $\Delta degSU$ Mutante (SLB254) und der DegU-Hypermutante (SLB255) und DegS-Hypermutante (SLB256) kombiniert und die TreA-Aktivität bestimmt. Die Zellen wurden in HMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl inkubiert und bei einer OD₅₇₈ von 1,5 ($\pm 0,2$) geerntet. Diese Proben wurden dann anschließend in den TreA-Enzymtest eingesetzt. In Abb. 19 B ist zu erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied auf transkriptioneller Ebene zwischen den Mutanten gab. Unter isotonischen Bedingungen betrug die TreA-Aktivität circa 10 Units und wurde unter hyperosmotischen Bedingungen um das circa Zehnfache angeschaltet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das TCS möglicherweise einen geringen Einfluss auf die Prolinsynthese hatte, dieser Einfluss jedoch nicht auf transkriptioneller Ebene stattfand.

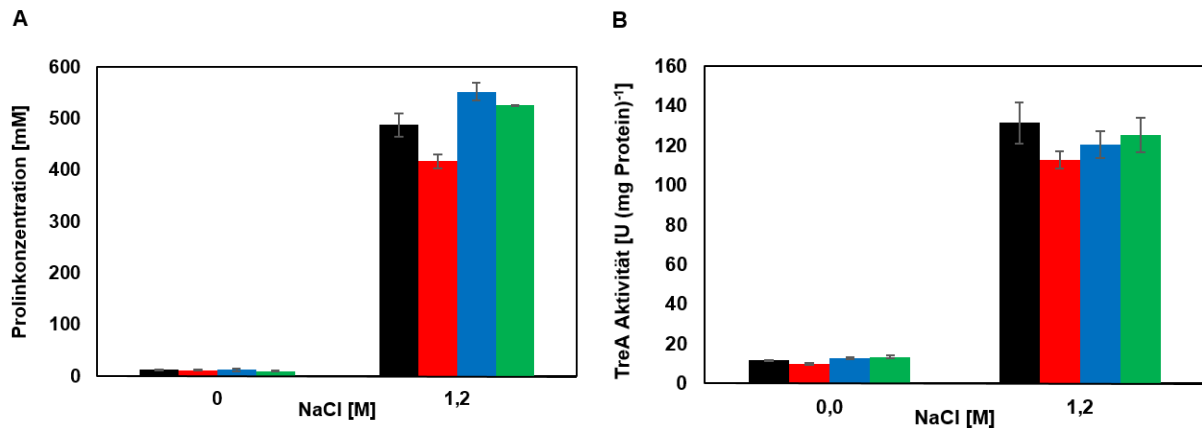


Abb. 19: Der Einfluss des DegS-DegU TCS auf die intrazelluläre Prolinkonzentration und die Promotoraktivität von *proH-treA*

(A) Bestimmung der intrazellulären Prolin Konzentration in den Stämmen 168 (Wildtyp, schwarz), SLB40 ($\Delta degSU$, rot), SLB49 [$degU32(Hy)$] und SLB169 [$degS200(Hy)$]. Die Stämme wurden in SMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert wurden, bei einer OD_{578} von 2 geerntet wurden und mittels des anschließenden Bates-Test wurde die intrazelluläre Prolinkonzentration bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet. (B) Gezeigt ist die *proH-treA* Fusion (SLB253, schwarz), sowie der Fusionsstämme SLB254 ($\Delta degSU$; rot), SLB255 [$degU32(Hy)$, blau] und SLB256 [$degS200(Hy)$, grün]. Die Stämme wurden in HMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert, bei einer OD_{578} von $1,5 \pm 0,2$ geerntet und anschließend im TreA-Enzymassay eingesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

In dem ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde das DegS-DegU Zwei-Komponenten System, sowie dessen regulatorische Proteine analysiert und die Salzinduktion der einzelnen Gencluster bestätigt. Weiterhin konnte unter den getesteten Bedingungen der positive Feedback Loop von DegU~P auf *degUP₃* nachgewiesen werden. Letztendlich wurde aufgeführt, dass das DegS-DegU TCS einen Einfluss auf das Wachstum von *B. subtilis* hat, da eine Deletion des DegS-DegU TCS zu einer geringen Verlängerung der Lag-Phase führte und eine Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus von DegU zu einem verbesserten Wachstum führte. Die Deletion des DegS-DegU TCS führte nur zu einer geringen Veränderung in der Akkumulation von Prolin, die Konzentration in der *degSU* Deletionsmutante lag leicht unterhalb der des Wildtyps. Beide Hypermutanten zeigten ein stark verbessertes Wachstum, jedoch akkumuliert nur die DegU-Hypermutante intrazellulär mehr Prolin.

2 Analyse des DegU~P Regulons und dessen Salzabhängigkeit

Die bisher in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse lassen vermuten, dass das DegS-DegU Zwei-Komponenten System eine wichtige Rolle bei der Adaptation an Salzstress spielt. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden zunächst bioinformatische Analysen durchgeführt um eventuelle Kandidaten zu identifizieren, die an der Adaptation an hyperosmotische Bedingungen beteiligt sind, also salzinduzierbar sind und von DegU~P abhängen. Vorherige Studien wurden genutzt um einen Vergleich zwischen den DegU~P Regulon (197) und dem Salz-Modulon zu ziehen (299). Mäder *et al.* (197) benutzten bei ihrer Analyse des DegS-DegU TCS einen Stamm der die *degU32(Hy)* Mutation beinhaltet und verglichen dessen Transkriptionsprofil während der exponentiellen und stationären Phase mit dem Expressionsprofil des Wildtyps. Die Analyse ergab das 54 Gene durch die Hypermutante in der exponentiellen und/ oder

der stationären Phase positiv reguliert werden. Die Makroarray-Analysen der salzgestressten Zellen, die Steil *et al.* durchgeführt haben (299), zeigte das 102 Gene salzinduzierbar sind. Während meiner Studie wurden die Rohdaten dieser Publikation erneut analysiert, da einige Gene die durch Kunst *et al.* (179) annotiert wurden, durch eine neuere Studie nicht als wahre Gene identifiziert wurden (20). Durch diese erneute Begutachtung wurden auch Gene gefunden, die durch Steil *et al.* nicht als salzinduzierbar annotiert wurden, jedoch alle Kriterien dafür erfüllten (299). Dadurch ergab sich, dass 111 Gene salzinduzierbar sind.

2.1 Bioinformatischer Vergleich des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons aus *B. subtilis*

Um die Rolle des DegS-DegU TCS unter hyperosmotischen Bedingungen zu analysieren, sowie um eine Idee zu bekommen, warum die Hypermutante unter diesen Bedingungen besser wachsen kann, wurden die Transkriptomdaten der Studie von Mäder *et al.* (197) und Steil *et al.* (299) verglichen. Der Vergleich der beiden Studien ergab, dass von den 54 Genen des DegU~P Regulons 16 Gene salzinduzierbar (mit einem Induktionsfaktor ≥ 3) waren. Setzte man die Untergrenze für den Induktionsfaktor auf 1,5 runter so waren 28 der 54 Gene, also über die Hälfte des DegU-Regulons, salzinduzierbar. Die Gene mit ihren entsprechenden Induktionsfaktoren, die in beiden Studien ermittelt wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt. Durch eine kürzlich erschienene Tiling-Array Studie wurde die Operonstruktur der einzelnen Gene analysiert und ebenfalls in dieser Tabelle aufgelistet (230).

Tabelle 2: Vergleich des DegU~P Regulons mit dem Transkriptom salzgestresster Zellen

Gen ^a		Induktionsfaktor			Operonstruktur [nach Nicholas <i>et al.</i> (230)]
		Mäder <i>et al.</i> (197) ^b		Steil <i>et al.</i> (299) ^c	
		hy/ wt (log)	hy/ wt (stat)	1.2 M NaCl/ 0 M NaCl (5µM Fe)	
BSU25880	<i>yqxJ</i>	-; -	2,1 ; 3,0	12,8	<i>yqxI-J</i>
BSU25890	<i>yqxI</i>	6,7 ; 10,3	2,1 ; 5,5	8,7	<i>yqxI-J</i>
BSU08160	<i>yfjB</i>	10,7 ; 14,4	-; -	6,7	<i>yfjA-B-C-D-E-F</i>
BSU31890	<i>yukC</i>	4,7 ; 4,0	-; -	6,0	<i>yukE-D-C-B-yueB-C-D</i>
BSU08170	<i>yfjA</i>	4,0 ; 10,0	1,2 ; 0,9	5,4	<i>yfjA-B-C-D-E-F</i>
BSU36210	<i>ywqH</i>	2,6 ; 3,5	2,6 ; 0,8	4,4	<i>ywqH-I-J-K-L</i>
BSU36200	<i>ywqI</i>	3,4 ; 4,1	2,0 ; 0,5	4,3	<i>ywqH-I-J-K-L</i>
BSU12180	<i>yjhA</i>	9,5 ; 17,8	-; -	4,2	<i>yjhA-B</i>
BSU08150	<i>yfjC</i>	6,2 ; 14,0	0,6 ; 1,9	4,1	<i>yfjA-B-C-D-E-F</i>
BSU36190	<i>ywqJ</i>	3,8 ; 4,0	3,0 ; 0,6	4,0	<i>ywqH-I-J-K-L</i>
BSU11040	<i>yitM</i>	- ; 1,6	3,5 ; 9,0	4,0	<i>yitP-O-M</i>
BSU35490	<i>degU</i>	6,8 ; 6,5	1,7 ; 1,4	3,9	<i>degS-degU</i>
BSU31900	<i>yukD</i>	2,1 ; 1,8	0,6 ; 0,9	3,7	<i>yukE-D-C-B-yueB-C-D</i>
BSU05100	<i>yddT</i>	1,1 ; 1,3	10,5 ; 4,2	3,3	<i>yddT</i>
BSU21320	<i>yomL</i>	-; -	6,2 ; 4,0	3,0	<i>yomL</i>

BSU36180	<i>ywqK</i>	-; -	2,0; -	3,0	<i>ywqH-I-J-K-L</i>
BSU31910	<i>yukE</i>	10,7 ; 5,7	0,4 ; 0,6	2,9	<i>yukE-D-C-B-yueB-C-D</i>
BSU02240	<i>mpr</i>	-; -	1,7 ; 1,3	2,9	<i>mpr-ybfJ</i>
BSU08140	<i>yfjD</i>	4,6 ; 5,5	-; 1,1	2,7	<i>yfjA-B-C-D-E-F</i>
BSU26920	<i>yraJ</i>	-; -	4,7 ; 10,0	2,2	<i>yraI-J</i>
BSU36170	<i>ywqL</i>	1,3 ; 2,2	1,1 ; 0,7	2,0	<i>ywqH-I-J-K-L</i>
BSU35890	<i>ywtA</i>	1,4 ; -	-; -	1,9	<i>pgsB-C-A-E</i>
BSU07840	<i>yfkN</i>	1,0 ; 1,5	0,5 ; 1,9	1,8	<i>yfkN</i>
BSU35500	<i>degS</i>	1,1 ; 1,0	0,8 ; 1,0	1,8	<i>degS-degU</i>
BSU13190	<i>ispA</i>	2,2 ; 3,0	10,8 ; 8,9	1,7	<i>ispA</i>
BSU02780	<i>ycdA</i>	8,6 ; 14,0	0,7; -	1,6	<i>ycdA</i>
BSU26930	<i>yraI</i>	-; -	3,4 ; 16,9	1,6	<i>yraI-J</i>
BSU12190	<i>yjhB</i>	3,0 ; 3,1	0,4 ; 0,5	1,5	<i>yjhA-B</i>

^a Die Gene sind nach ihrer Salzinduktion von stark nach schwach sortiert

^b Die Induktionsfaktoren sind für zwei unabhängige Macroarray Experimente gezeigt (- bedeutet, dass das Signal unter der Signifikanzgrenze lag). Hy steht für die Hypermutable und wt für den Wildtyp. Log bedeutet exponentielle Wachstumsphase und stat bezieht sich auf die stationäre Phase

^c Der Induktionsfaktor stellt das Verhältnis der Signalstärke von Zellen dar, die in Medium mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert wurden

Literaturrecherchen über die Gene aus dem Überlapp des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons ergaben, dass 3 Operons (*yukE-yueD*, *pgsB-E* und *degSU*), sowie *ycdA* bereits als DegU~P abhängig identifiziert wurden (19, 240, 244, 341). Das *yukE-yueD* Operon wurde kürzlich als ESAT-ähnliches Sekretionssystem (im Folgenden als T7SS abgekürzt) identifiziert, jedoch ist eine physiologische Rolle des T7SS in *B. subtilis* bisher nicht bekannt. Das *pgsB-E* Operon ist für die Poly-γ-glutamat Synthese notwendig und das *ycdA* Gen spielt während des Schwärmens eine essentielle Rolle. Das DegS-DegU TCS reguliert während der stationären Phase die Induktion und Synthese von zwei sekretierten degradierenden Enzymen (Subtilisin und Levansucrase), die auch durch Salzstress reguliert werden (180). Durch den bioinformatischen Vergleich konnten noch zwei weitere Enzyme identifiziert werden, die neben ihrer Abhängigkeit von DegU~P auch durch hyperosmotische Bedingungen induziert werden. Diese Enzyme sind die Metalloprotease Mpr und die intrazelluläre Serinprotease IspA. Die Analyse der restlichen gemeinsamen Gene zeigte jedoch, dass vermutlich keines der synthetisierten Genprodukte während der Anpassung an hyperosmotische Bedingungen eine Rolle spielen könnte. Jedoch haben auch die meisten Gene aus dem Überlapp keine bekannte Funktion.

Tabelle 3: Bioinformatische Analysen der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons

	Gene	TMD ^a	Signalpeptid ^b	Funktion ^c
BSU25890	<i>yqxI</i>	/	Ja	Unbekannt
BSU25880	<i>yqxJ</i>	/	/	Unbekannt mit coiled coil Domäne
BSU08170	<i>yfjA</i>	/	/	Unbekannt; ähnlich zu einem Virulenzfaktor; WXG100 Domäne
BSU08160	<i>yfjB</i>	/	/	Unbekannt mit "low complexity" Domäne
BSU08150	<i>yfjC</i>	/	/	Unbekannt
BSU08140	<i>yfjD</i>	2	/	Unbekannt
BSU08130	<i>yfjE</i>	1	/	Unbekannt
BSU08120	<i>yfjF</i>	4	/	Unbekannt
BSU31910	<i>yukE</i>	/	/	Sekretiertes Protein des ESAT-6 Sekretionssystems (WXG100 Domäne)
BSU31900	<i>yukD</i>	/	/	Unbekannt mit Ubiquitin-ähnlicher Faltung
BSU31890	<i>yukC</i>	1	/	putatives Membranprotein
BSU31875	<i>yukB</i>	2	/	FtsK/SpoIIIE ATPase
BSU31860	<i>yueB</i>	6	/	Unbekannt, ähnlich zu bakteriophagen SPP1 Rezeptor, 6 Transmembrandomänen
BSU31850	<i>yueC</i>	1	/	T7SS zugehöriges Protein
BSU31840	<i>yueD</i>	/	/	Enoyl-(Acyl Transporter Protein) Reduktase
BSU36210	<i>ywqH</i>	/	/	Unbekannt mit coiled coil Domäne
BSU36200	<i>ywqI</i>	/	/	Unbekannt mit coiled coil Domäne
BSU36190	<i>ywqJ</i>	/	/	putative Transposase
BSU36180	<i>ywqK</i>	/	/	Unbekannt
BSU36170	<i>ywqL</i>	/	/	Unbekannt, ähnlich zur Endonuclease V
BSU12180	<i>yjhA</i>	/	Ja	Unbekannt mit DUF4352 Domäne
BSU12190	<i>yjhB</i>	/	/	unbekannt, ähnlich zur ADP-Ribose Pyrophosphatase
BSU11070	<i>yitP</i>	1	/	Unbekannt
BSU11055	<i>yitO</i>	6	/	putatives integrales Protein der inneren Membran
BSU11040	<i>yitM</i>	2	Ja	Unbekannt
BSU35500	<i>degS</i>	/	/	Histidinkinase des DegS-DegU TCS
BSU35490	<i>degU</i>	/	/	Antwortregulator des DegS-DegU TCS
BSU26930	<i>yraI</i>	1	Ja	Unbekannt
BSU26920	<i>yraJ</i>	1	Ja	Unbekannt mit sh3 Domäne
BSU35900	<i>pgsB</i>	/	/	Poly-γ-glutamat Synthetase
BSU35890	<i>pgsC</i>	4	/	Ähnlich zu einem kapselähnlichen Polyglutamat Biosynthese Protein
BSU35880	<i>pgsA</i>	1	/	Ähnlich zu einem kapselähnlichen Polyglutamat Biosynthese Protein
BSU35870	<i>pgsE</i>	1	/	Stimuliert die Poly-γ-glutamat Produktion in der Anwesenheit von Zink

BSU02240	<i>mpr</i>	1	Ja	extrazelluläre Metalloprotease
BSU02250	<i>ybfJ</i>	/		putatives Lipoprotein
BSU05100	<i>yddT</i>	/	Ja	Unbekannt
BSU21320	<i>yomL</i>	/	Ja	Unbekannt
BSU07840	<i>yfkN</i>	2	Ja	Extrazelluläre 2,3 zyklische Nukleotid Phosphodiesterase, 2' (or 3') Nukleotidase und 5' Nukleotidase
BSU13190	<i>ispA</i>	/	/	intrazelluläre Serineprotease
BSU02780	<i>ycdA</i>	1	Ja	Lipoprotein, nötig für das Schwärmen (DUF4352)

^{a, b} Die Ermittlung der Transmembrandomänen (TMD) und einer potentiellen Signalsequenz (Signalpeptid) erfolgte mit Hilfe der Programme SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) und TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). „/“ bedeutet das durch die Programme keine Transmembrandomäne oder Signalsequenz gefunden wurde.

^c Die potentielle Funktion wurde mittels BLAST Search Analysen oder SubtiList Datenbank identifiziert. Die Domänen wurden über PFAM (<http://pfam.xfam.org/search>) und SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) ermittelt.

2.2 Transkriptionelle Analyse potentiell salzinduzierbarer und DegU~P abhängiger Gene

Durch den Vergleich der beiden Studien wurden 10 polycistronische und 5 monocistronische Transkriptionseinheiten identifiziert, deren Expression einerseits von DegU~P abhängt und andererseits durch Salz induziert wird. Eine Frage die sich dadurch stellte war, ob die Gene tatsächlich durch hyperosmotische Bedingungen induzierbar sind und ob diese Expression von dem DegS-DegU TCS abhängt. Um diese Frage zu beantworten wurde zu jedem Operon aus dem Überlapp eine *treA* Fusion konstruiert und die Promotoraktivität in verschiedenen genetischen Hintergründen [Wildtyp; $\Delta degSU$; *degU32*(Hy) und *degS200*(Hy)] unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen getestet. Weiterhin wurden Kontroll-*treA* Fusionen zu Genen konstruiert, die nur salzinduzierbar sind (*proH* und *opuA*) oder nur von DegU~P abhängen (*aprE*, *sacB*, *yvpB* und *xynD*). Alle Fusionskonstrukte in den verschiedenen Hintergründen, sowie die Länge der Konstrukte sind in Tabelle 18 aufgelistet. Aus dem Vergleich geht hervor, dass das DegS-DegU TCS durch Salz induzierbar ist und von DegU~P abhängig ist. Das DegS-DegU TCS wurde in dieser Hinsicht schon hinreichend in dem ersten Teil dieser Arbeit analysiert, sodass es in diesem Abschnitt nicht mit einbezogen wird. Alle Stämme wurden in Helmann Minimalmedium mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert. In der exponentiellen Phase wurden Proben geerntet und anschließend in dem TreA-Enzymassay eingesetzt. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse als Induktionsfaktoren dargestellt. Die Ergebnisse zu jeder einzelnen Fusion sind im Anhang in Abb. 53 aufgeführt.

2.2.1 Die Salzinduktion der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons ist nicht abhängig von dem DegS-DegU TCS

Die Analyse dieser Gene sollte zum einen die Frage beantworten, ob die Salzinduktion der ausgewählten Gene in der Tat vorliegt und ob diese Salzinduktion abhängig von dem DegS-DegU TCS ist. Hierfür wurde die Salzinduktion (TreA-Aktivität in HMM + 1,2 M NaCl / TreA-Aktivität in HMM) der Reportergerkonstrukte im Wildtyp, sowie in der *degSU* Deletionsmutante berechnet. Diese Salzinduktionen sind in Abb. 20 dargestellt. Es wurde eine Grenze der Salzinduktion mit einem Faktor

$\geq 1,5$ genommen, da dieser Wert auch gewählt wurde um die Vergleiche zwischen dem Salz-Modulon und dem DegU~P Regulon zu ziehen.

Die Kontrollen *proH-treA* und *opuA-treA* zeigten eine eindeutige Salzinduktion mit einem Faktor von 7 und 11, welche nicht von dem DegS-DegU TCS abhängig war. Für die Gene die nur von DegU~P abhängen und in den Transkriptomdaten (299) keine erhöhte Expression unter hyperosmotischen Bedingungen aufwiesen, konnte unter den getesteten Bedingungen dennoch eine Salzinduktion gemessen werden. Im Falle von *xynD* und *yvpB* war diese sehr schwach (2-fache Induktion). Die Deletion des DegS-DegU TCS änderte nichts an der erhöhten Expression unter hyperosmotischen Bedingungen. Für die Kontrolle *sacB* konnte in einer vorangegangenen Studie bereits gezeigt werden, dass die Transkription salzinduzierbar war (180). Dies konnte in meiner Analyse bestätigt werden, weiterhin konnte immer noch eine Abhängigkeit von dem DegS-DegU TCS nachgewiesen werden. Für die Expression von *aprE* wurde bisher eine Reprimierung unter hyperosmotischen Bedingungen nachgewiesen (180). Dieses Expressionsmuster konnte im Verlauf der gegenwärtig vorliegenden Studie nicht bestätigt werden, da auch eine Salzinduktion im Wildtyp und der $\Delta degSU$ Mutante um den Faktor 3 gemessen wurde.

Die Analyse der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons ergab, dass in sechs Fällen (*ycdA*, *yddT*, *yral*, *mpr*, *yukE* und *ywqH*) eine Salzinduktion der Promotoren detektiert wurde und diese sich nicht durch die Deletion des DegS-DegU TCS reduzieren ließ. Für *ywqH*, *yukE*, *mpr* und *ycdA* konnte eine moderate Salzinduktion ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wurde die Expression von *yddT* und *mpr* stark in hypertonen Medium angeschaltet. Die Auswertung der Salzinduktion der anderen acht Gene (*yfkN*, *ispA*, *yqxl*, *yitP*, *yomL*, *yfjA*, *yjhA* und *pgsB*) ergab in allen Fällen eine mindestens Fünffache Erhöhung der Expression in Medium mit 1,2 M NaCl. Die Deletion des DegS-DegU TCS führte zu einer Verringerung der Salzinduktion, jedoch nicht zu einem kompletten Verlust der Salzinduktion.

Obwohl die Salzinduktion in allen Fällen nicht komplett verhindert wurde, so führte eine Deletion des DegS-DegU TCS in 9 Fällen (*yfkN*, *ispA*, *yqxl*, *yitP*, *pgsB*, *yfjA*, *yjhA*, *yukE* und *ywqH*) zu einer starken Reduktion der Promotoraktivität. Sowohl unter isoosmotischen, als auch unter hyperosmotischen Bedingungen reduzierte sich die Promotoraktivität der *treA*-Fusionen in der *degSU* Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Expression der restlichen Gene zeigte keine Veränderung in der Promotoraktivität, wenn das DegS-DegU TCS deletiert wurde (Abb. 53).

Zusammenfassend ist in Abb. 20 dargestellt, dass die analysierten Gene eine eindeutige Salzinduktion im Wildtyp um mindestens das Zweifache aufweisen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Deletion des DegS-DegU TCS in einigen Fällen zu einer Reduktion der Salzinduktion führt, jedoch keine komplette Verhinderung dieser Induktion bewirkt.

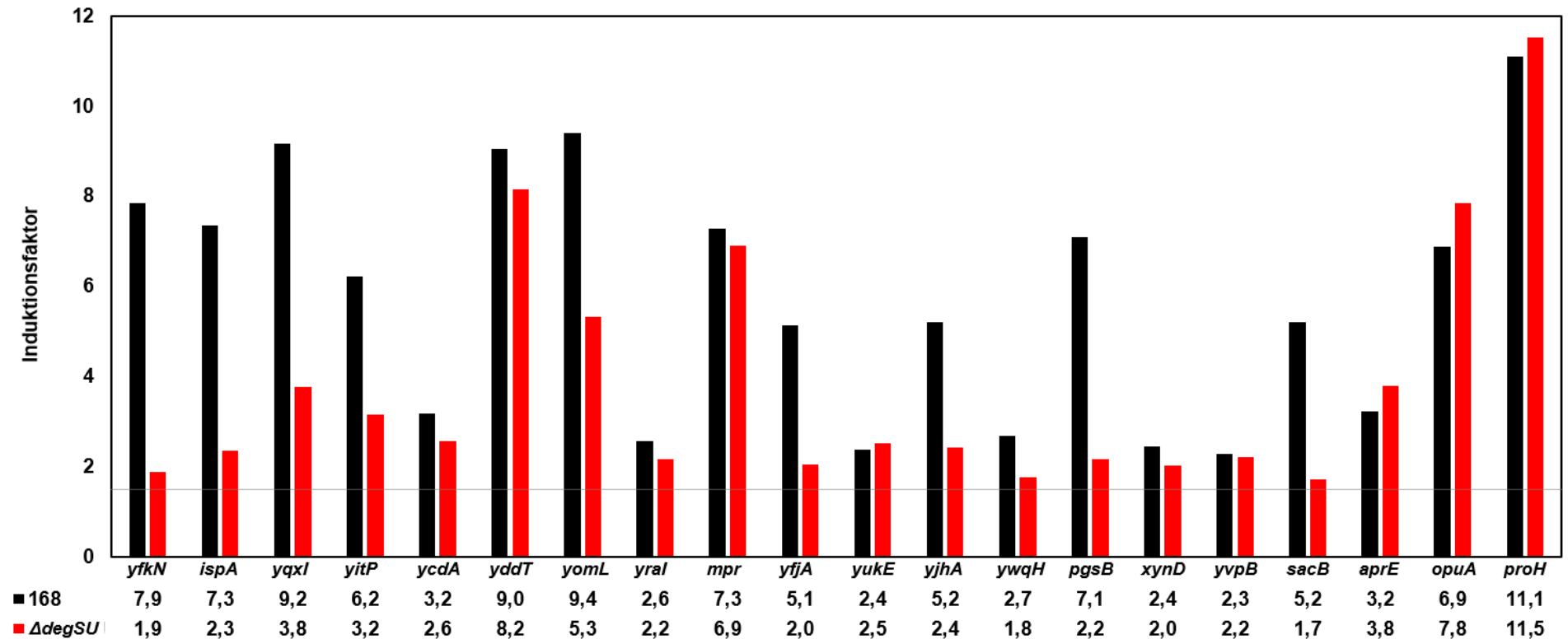


Abb. 20: Salzabhängigkeit der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons

Dargestellt ist die Salzinduktion der verschiedenen Reportergenkonstrukte. Dieser wird als Quotient aus (TreA-Aktivität in HMM 1,2 M NaCl / TreA-Aktivität in HMM 0M NaCl) ausgedrückt. Die Reportergenkonstrukte sowie die Stämme, die aus der Einbringung der Konstrukte in den Wildtyp 168 und den Deletionsstamm $\Delta degSU$ entstanden sind, sind in Tabelle 18 aufgeführt. Diese Stämme wurden in HMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert, in der exponentiellen Phase geerntet und dann in den TreA Enzymtest eingesetzt. Der Salz-Induktionsfaktor im Wildtyp ist in schwarz dargestellt und in der $\Delta degSU$ Mutante in rot. Die genauen Angaben der Induktionsfaktoren sind tabellarisch unter dem Graphen aufgeführt. Die graue Linie markiert die Untergrenze des Induktionsfaktors von 1,5 bei dem noch eine Salzinduktion gegeben ist. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

2.2.2 Die Abhängigkeit verschiedener Gene von DegU~P unter isoosmotischen Bedingungen

Eine weitere Frage die es zu beantworten galt war neben der Salzinduktion die Abhängigkeit der Expression der ausgewählten Gene von DegU~P. Genauer gesagt, sollte getestet werden ob DegU~P einen positiven Einfluss auf die gemeinsamen Gene des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons hat und somit als Aktivator für diese Gene fungiert. Um dies zu testen wurden alle Reportergenkonstrukte neben der Einbringung in den Wildtyp noch in die DegU-Hypermutable sowie in die DegS-Hypermutable eingebracht. Die daraus resultierenden Stämme sind in Tabelle 18 aufgelistet. Um den Einfluss des Antwortregulators DegU~P auf die Gene zu analysieren wurden die Stämme in HMM kultiviert, bei Eintritt in die mittlere exponentielle Phase Proben geerntet und diese danach in dem TreA-Enzymassay eingesetzt. In Abb. 21 ist die putative DegU~P Abhängigkeit der Expression der Gene aus dem Überlapp unter isoosmotischen Bedingungen (0 M NaCl) dargestellt. Der Einfluss von DegU~P ist in diesem Fall ebenfalls als Induktionsfaktor dargestellt. Dabei wurde die Expression im Wildtyp mit einem Induktionsfaktor von 1 gleichgesetzt. Die Werte für die DegU-Hypermutable und DegS-Hypermutable ergeben sich aus dem Quotienten aus der ermittelten Promotoraktivitäten der Gene in der DegU-Hypermutable beziehungsweise DegS-Hypermutable und der Promotoraktivität der Gene im Wildtyp. Demnach bedeutet ein Quotient über 1, dass die Genexpression durch DegU~P aktiviert wird. Ein Quotient unter 1 bedeutet, dass die Expression der Gene in den Hypermutanten niedriger waren als die Promotoraktivitäten im Wildtyp. Die Analyse der DegU~P Induktion, basierend auf diesen Kriterien, resultierte in verschiedenen Ergebnissen.

Zunächst konnte für die Kontrollen *proH* und *opuA* sowohl in der DegU-Hypermutable als auch in der DegS-Hypermutable eine DegU~P unabhängige Expression festgestellt werden. Bei ungestressten Kulturen betrug der Induktionsfaktor entweder genau eins oder unter eins. Für die Kontrollen (die zu dem DegU~P Regulon gehören) *xynD*, *yvpB*, *sacB* und *aprE* konnte eine erhöhte Expression durch DegU~P nachgewiesen werden, jedoch mit unterschiedlichen Ausprägungen. Für *xynD* und *yvpB* wurde in beiden Hypermutanten eine geringfügige Erhöhung der Expression durch DegU~P bestätigt. Für *sacB* wurde in beiden Hypermutanten ein Quotient von 3,0 berechnet, sodass erhöhte Konzentrationen an DegU~P zu einer verbesserten Expression von *sacB* führten. Für *aprE* zeigte sich eine starke Steigerung der Aktivität durch die DegU-Hypermutable, jedoch nur eine geringe Verbesserung der Promotoraktivität von *aprE* durch die DegS-Hypermutable.

Die Analyse der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons ergab, dass die Expression von fünf Reportergenkonstrukten (*yddT*, *yomL*, *mpr*, *yukE* und *ywqH*) nur geringfügig durch erhöhte Konzentrationen von DegU~P beeinflusst wurden. Dies zeigte sich darin, dass die Induktionsfaktoren für diese Gene in beiden Hypermutanten unter 2 lagen. Im Gegensatz dazu wurde die Expression der Reportergenkonstrukte von *yfkN*, *ispA*, *yqxl*, *yitP*, *ycdA*, *yral*, *yfjA*, *yjHA* und *pgsB* unter isotonischen Bedingungen stark durch DegU~P beeinflusst. In allen Fällen lag der Induktionsfaktor in der DegU-Hypermutable und DegS-Hypermutable über 2.

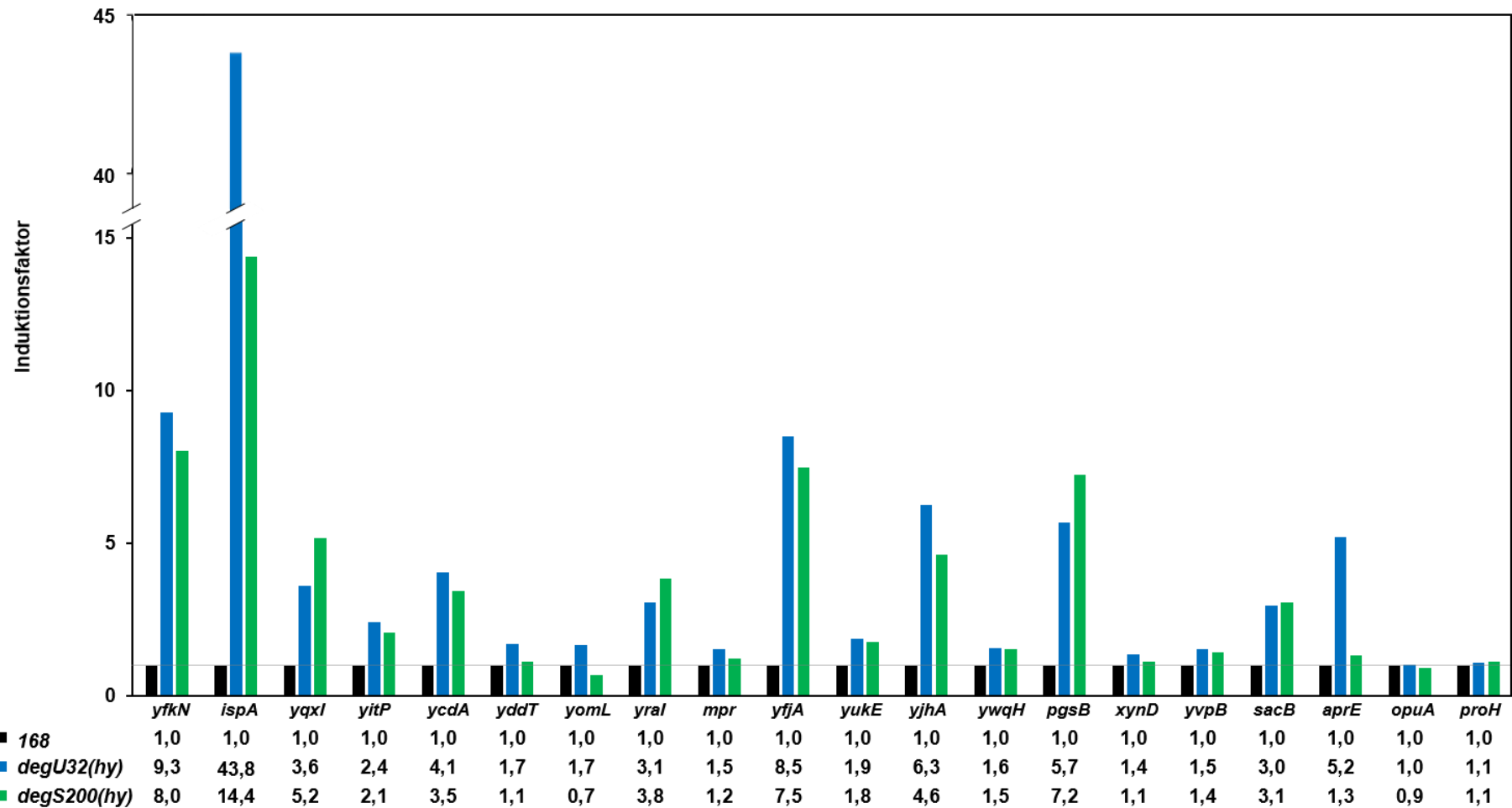


Abb. 21: Abhängigkeit diverser Gene von DegU~P unter pyhsologischen Bedingungen

Dargestellt ist die Abhängigkeit der verschiedenen Reportergerkonstrukte von DegU~P unter isoosmotischen Bedingungen. Dieser wird als Quotienten aus (TreA-Aktivität in der DegU oder DegS-Hypermutante/ TreA-Aktivität im Wildtyp) ausgedrückt. Die Reportergerkonstrukte sowie die Stämme, die aus der Einbringung der Konstrukte in den Wildtyp 168 und die DegU oder DegS-Hypermutante entstanden sind, sind in Tabelle 18 aufgeführt. Diese Stämme wurden in HMM kultiviert, in der exponentiellen Phase wurden Proben gezogen, die dann in den TreA-Enzymtest eingesetzt wurden. Der Induktionsfaktor im Wildtyp ist in schwarz dargestellt, die Induktion durch die DegU-Hypermutante in blau und die Induktion durch die DegS-Hypermutante in grün. Die genauen Angaben der Induktionsfaktoren sind tabellarische unter dem Graphen aufgeführt. Die graue Linie markiert die Induktion des Wildtyps, die auf 1 gesetzt wurde um die Induktion in den beiden Hypermutanten mit dem Wildtyp vergleichen zu können. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

Zusammenfassend konnte unter isoosmotischen Bedingungen gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration an DegU~P einen Einfluss auf die Expression aller Genen hat, die aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons stammen. Das Ausmaß des Einflusses von DegU~P auf die Promotoraktivität schwankte von sehr gering (Induktionsfaktor $\leq 1,5$) über moderat (Induktionsfaktor ≤ 5) und stark (Induktionsfaktor zwischen 5 und 10) bis enorm in dem Falle von *ispA* (Induktionsfaktoren von 44 und 14 in der DegU- und DegS-Hypermutante). Dieser Versuch diente einerseits als Bestätigung der Transkriptomdaten, dass alle Gene aus dem Überlapp von den DegU~P beeinflusst werden. Andererseits diente diese Analyse auch als Kontrolle für die nachfolgende Analyse der gemeinsamen Gene in Bezug auf ihre DegU~P Abhängigkeit unter hyperosmotischen Bedingungen.

2.2.3 Die Abhängigkeit verschiedener Gene von DegU~P unter hyperosmotischen Bedingungen

Ein wichtiger Aspekt dieser Studie befasste sich mit der Frage, ob das DegS-DegU TCS einen Einfluss auf die Salzstressadaptation von *B. subtilis* hat und ob die zytoplasmatische Sensorkinase DegS womöglich der Salzsensormodulon ist. Um diesen Gesichtspunkt zu bearbeiten, wurde getestet, in wie weit sich das Expressionsmuster der Gene durch DegU~P unter hyperosmotischen Bedingungen verändert. Es wurden also die Bedingungen aus beiden Transkriptomstudien kombiniert. Hierfür wurden die Kontrollreportergenfusionen (wie bereits vorher beschrieben *opuA*, *proH*, *aprE*, *sacB*, *yvpB* und *xynD*) in den DegU- und DegS-Hypermutanten-Hintergrund eingebracht und unter hyperosmotischen Bedingungen in HMM kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet. Diese Proben wurden in den TreA-Aktivitätstest eingesetzt und die Ergebnisse sind sowohl als Einzelergebnisse in Abb. 53 dargestellt, als auch in Abb. 22 als Zusammenfassung. Das selbe Vorgehen wurde mit den Genen aus dem Überlapp (*yfkN*, *ispA*, *yqxl*, *yitP*, *ycdA*, *yddT*, *yomL*, *yral*, *mpr*, *yfjA*, *yukE*, *yjhA*, *ywqH* und *pgsB*) des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons angewendet. Wie bereits in der Analyse der DegU~P regulierten Gene unter isoosmotischen Bedingungen werden die Ergebnisse auch als Induktionsfaktoren dargestellt. Die Expression der Reportergenkonstrukte im Wildtyp wurde auf einen Induktionsfaktor von 1 gesetzt. Die Werte für die DegU- und DegS-Hypermutante ergaben sich aus dem Quotienten, wenn man die ermittelten Promotoraktivitäten der einzelnen Gene in den Hypermutanten durch die Promotoraktivität dieser Gene im Wildtyp unter hyperosmotischen Bedingungen dividiert. Demnach bedeutet ein Quotient über 1, dass die Genexpression durch DegU~P aktiviert wird und ein Quotient unter 1 bedeutet, dass die Expression der Gene in den Hypermutanten niedriger war als die Expression im Wildtyp.

Für die Reportergenfusion von *opuA* und *proH* konnte unter hyperosmotischen Bedingungen keine Steigerung der Expression durch eine erhöhte DegU~P Konzentration detektiert werden. Der Induktionsfaktor für beide Gene in beiden Hypermutanten betrug unter 1. Für die Gene, die durch DegU~P reguliert werden (*xynD*, *yvpB*, *sacB* und *aprE*) wurde unter ungestressten Bedingungen nur eine leichte Erhöhung der Promotoraktivität in Abhängigkeit von DegU~P festgestellt. Unter hyperosmotischen Bedingungen konnte nur eine teilweise Abhängigkeit von DegU~P nachgewiesen werden. Für *aprE* wurde diese Abhängigkeit eindeutig bestätigt, da der Induktionsfaktor in der DegU-Hypermutante 26 und in der DegS-Hypermutante 28 betrug. Für *xynD* und *sacB* wurde in beiden Hypermutanten nur eine geringe Erhöhung der Expression durch DegU~P erreicht. Im Gegensatz dazu konnte für *yvpB* keine Abhängigkeit von DegU~P unter den getesteten Bedingungen festgestellt werden. In beiden

Hypermutanten betrug der Quotient weniger als eins. Dieses Muster konnte auch in dem Fall von *mpr* bestimmt werden.

Für die Gene *yfjA*, *yukE*, *yjhA*, *ywqH* und *pgsB* wurde ein Induktionsfaktor berechnet, der sogar unter 0,5 lag. In diesem Fall hatte die Erhöhung der DegU~P Konzentration einen negativen Einfluss auf die Promotoraktivität dieser Gene unter hyperosmotischen Bedingungen.

Für die *yfkN-treA* Fusion konnte in der DegU-Hypermutante keine Erhöhung der Expression ermittelt werden, jedoch fand eine leichte Induktion der Expression in der DegS-Hypermutante statt. Sowohl für *yomL* als auch für *yddT* konnte ein moderater Einfluss der beiden Hypermutanten auf die Promotoraktivität unter hyperosmotischen Bedingungen festgestellt werden. Für die Gene *ispA*, *yqxl*, *yitP*, *ycdA* und *yraI* wurde gezeigt, dass die Erhöhung der DegU~P Konzentration eine aktivierende Wirkung auf die Promotoraktivität der einzelnen Gene hat. In der DegU-Hypermutante konnte für *ispA* eine Achtfache Erhöhung der Promotorexpression unter hyperosmotischen Bedingungen kalkuliert werden. Im Gegensatz dazu wiesen *yqxl*, *yitP*, *ycdA* und *yraI* in der DegU-Hypermutante eine mäßig starke Erhöhung der Expression auf (Induktionsfaktoren zwischen 4 und 7).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Konzentration von DegU~P unter hyperosmotischen Bedingungen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Gene aus dem Überlapp des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons hat. So wurde für die Reporterfusionen von *mpr*, *yfjA*, *yukE*, *yjhA*, *ywqH* und *pgsB* ein reprimierender Einfluss von DegU~P auf die Promotoraktivität festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde die Promotoraktivität von *yfkN*, *ispA*; *yqxl*, *yitP*, *ycdA*, *yddT*, *yomL* und *yraI* unter hyperosmotischen Bedingungen durch die erhöhten DegU~P Mengen gesteigert. Weiterhin konnte in diesem Fall ein deutlicher Unterschied zwischen der DegU-Hypermutante und der DegS-Hypermutante festgestellt werden, der wahrscheinlich in dem Ursprung dieser Mutantenallele begründet ist.

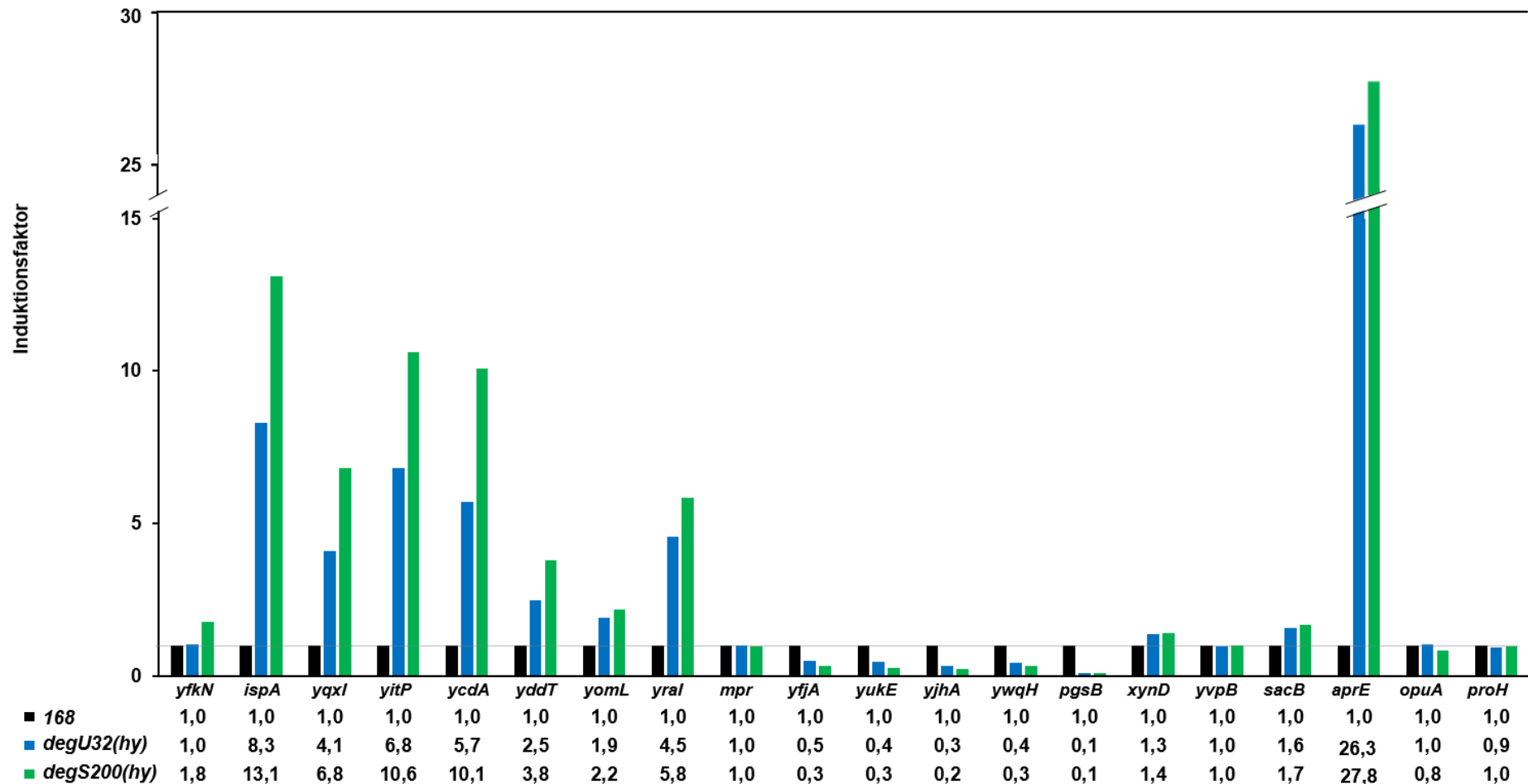


Abb. 22: Abhängigkeit diverser Gene von DegU~P unter hyperosmotischen Bedingungen

Dargestellt ist die Abhängigkeit der verschiedenen Reportergenkonstrukte von DegU~P unter hyperosmotischen Bedingungen. Dieser wird als Quotienten aus (TreA-Aktivität in der DegU oder DegS-Hypermutable/ TreA-Aktivität im Wildtyp) ausgedrückt. Die Reportergenkonstrukte sowie die Stämme, die aus der Einbringung der Konstrukte in den Wildtyp 168 und die DegU oder DegS-Hypermutable entstanden sind, sind in Tabelle 18 aufgeführt. Diese Stämme wurden in HMM mit 1,2 M NaCl kultiviert, in der exponentiellen Phase wurden Proben gezogen, die dann in den TreA-Enzymtest eingesetzt wurden. Der Induktionsfaktor im Wildtyp ist in schwarz dargestellt, die Induktion durch die DegU-Hypermutable in blau und die Induktion durch die DegS-Hypermutable in grün. Die genauen Angaben der Induktionsfaktoren sind tabellarisch unter dem Graphen aufgeführt. Die graue Linie markiert die Induktion des Wildtyps, die auf 1 gesetzt wurde um die Induktion in den beiden Hypermutable mit dem Wildtyp vergleichen zu können. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

In diesem Kapitel wurden durch bioinformatische Analyse 10 polycistronische und 5 monocistronische Transkriptionseinheiten identifiziert, die durch DegU~P positiv reguliert werden und durch eine erhöhte Osmolarität eine gesteigerte Expression vorweisen. Durch transkriptionelle Reportergenfusionen zu diesen Genen konnte die osmotische Induktion belegt werden. Interessanterweise zeigte sich, dass die Salzinduktion unabhängig von dem DegS-DegU TCS ist. Dies wurde durch die Deletion des DegS-DegU TCS belegt, da in dieser Mutante trotzdem noch eine Erhöhung der Expression der Gene in hypertonen Medium im Vergleich zu isotonischem Medium möglich war. Weiterhin wurde durch die Nutzung der sogenannten DegU- und DegS-Hypermутanten gezeigt, dass während ungestresster Bedingungen eine Erhöhung der Promotoraktivität stattfindet. Dem entsprechend wird die Expression der Gene durch erhöhte Konzentrationen an DegU~P gesteigert, es zeigten sich aber deutliche Unterschiede in dem Grad der erhöhten Promotoraktivität. Des Weiteren konnte die Erhöhung der Promotoraktivität durch DegU~P unter salzgestressten Bedingungen nicht in allen Fällen bestätigt werden. Für *ispA*, *yqxI*, *yitP*, *ycdA* und *yral* wurden unter beiden getesteten Bedingungen eine Erhöhung der Expression durch die Hypermутanten nachgewiesen. Diese Gene waren salzinduzierbar und wurden durch eine Erhöhung der Menge an DegU~P noch stärker exprimiert. Für *mpr* konnte auch eine Salzinduktion ermittelt werden, jedoch ist die Expression des Operons *mpr-ybfJ* nicht von einer erhöhten Menge an DegU~P abhängig. Unter isoosmotischen Bedingungen zeigte sich nur ein geringfügiger Einfluss von DegU~P auf die Expression, dieser ging unter hyperosmotischen Bedingungen vollständig verloren. *yukE* und *ywqH* zeigten unter normal physiologischen Bedingungen (0 M NaCl) eine leicht erhöhte Expression, wenn die Konzentration an DegU~P erhöht wurde. Diese Erhöhung schlug unter hyperosmotischen Bedingungen um, da erhöhte Konzentrationen an DegU~P zu einer Reprimierung der Expression im Vergleich zu der Promotoraktivität im Wildtyp führten. Dieses Expressionsmuster wird bei *yfjA*, *yjhA* und *pgsB* noch deutlicher. Für diese Gene konnte eine deutliche Steigerung der Expression unter normal physiologischen Bedingungen in Abhängigkeit von der DegU~P Konzentration gemessen werden. Unter hyperosmotischen Bedingungen war jedoch eine starke Repression dieser Salzinduktion festzustellen. Ein ähnliches Muster ergab sich für die *yfkN-træA* Reportergenfusion. Unter isoosmotischen Bedingungen wurde die Expression durch hohe Konzentrationen an DegU~P gesteigert, jedoch unter hyperosmotischen Bedingungen nicht mehr. Die Expression blieb in den Hypermутanten ungefähr auf Wildtyp Niveau. Für *yddT* und *yomL* stellte sich heraus, dass erhöhte Konzentrationen an DegU~P kaum einen Einfluss auf die Expression während ungestresster Bedingungen hatte. Im Gegensatz dazu wurde die Promotoraktivität beider Gene unter hyperosmotischen Bedingungen in den Hypermутanten im Vergleich zum Wildtyp erhöht.

2.3 Detaillierte Analyse des ESAT-ähnlichen Sekretionssystem

Während der Analyse der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons konnte einem Operon (*yukE-yueD*) eine Funktion zugeordnet werden (19). Das Operon weist Homologien zu dem Typ VII Sekretionssystems aus *Staphylococcus aureus* auf (Abb. 23) und weitere Analysen identifizierten das Operon als aktives Sekretionssystem in *B. subtilis* (19, 143). Jedoch konnte dem Sekretionssystem in *B. subtilis* noch keine physiologische Rolle zugewiesen werden. Das ESX-Sekretionssystem wurde als erstes in *Mycobacterium tuberculosis* identifiziert. In diesem Organismus

konnte demonstriert werden, dass es zwei kleine Proteine exportiert und das ganze System wichtig für die Virulenz ist (26, 344). Weitere T7SS wurden in anderen Pathogenen wie *Staphylococcus aureus* und *Bacillus anthracis* entdeckt, bei denen das System auch eine wichtige Rolle während der Virulenz spielt (48, 98). Die T7SS werden anhand der sekretierten Proteine identifiziert, welche alle ein zentrales WXG Motiv und eine Länge von circa 100 Aminosäuren besitzen. Ein weiteres konserviertes Protein des T7SS ist eine ATPase, welche zu der FtsK/SpoIIIE ATPase Familie gehört und in einem breiten Spektrum der Firmicuten und Actinobakterien vorkommt. Neben der Rolle während der Virulenz konnte in *Streptomyces scabies* eine Funktion des T7SS während der Sporulation nachgewiesen werden (95). In *B. subtilis* wurde ein Gencluster identifiziert, welches Homologe zu dem T7SS Gencluster aus *S. aureus* besitzt und nicht essentiell ist (Abb. 23) (143). Detaillierte Studien demonstrierten, dass YukE das einzige bisher nachgewiesene sekretierte Protein des T7SS in *B. subtilis* ist und die Sekretion von jedem der Proteine, welche von dem *yukE-yueD* Gencluster synthetisiert werden, abhängig ist (143). Letztendlich konnte gezeigt werden, dass das T7SS in der stationären Phase seine maximale Expression hat und diese Expression von DegU~P abhängt (19). Bisher konnten dem T7SS in verschiedenen Pathogenen eine Rolle während der Virulenz zu geordnet werden. In *B. subtilis* konnte dem T7SS jedoch noch keine physiologische Rolle zu gewiesen werden. Um die Rolle des T7SS näher zu verstehen wurde das Gencluster, welches für das Sekretionssystem kodiert, näher analysiert.

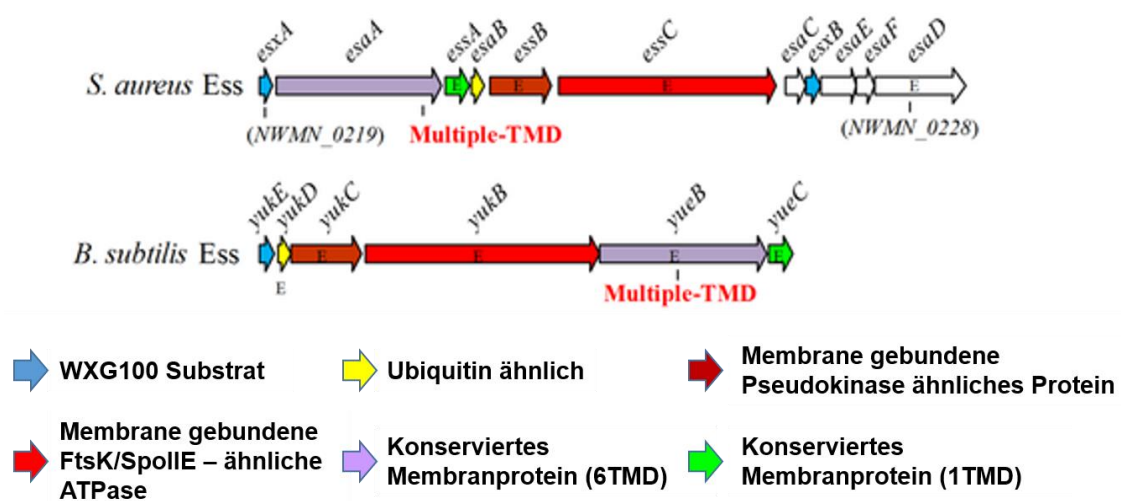


Abb. 23: Schematische Darstellung des Genclusters, welches für Komponenten des T7SS in *S. aureus* und *B. subtilis* kodiert

Gene die Proteine kodieren, dessen Domänen konserviert sind, werden in den selben Farben dargestellt. Gene die spezifisch für das jeweilige T7SS sind, sind in weiß dargestellt. Die verschiedenen Eigenschaften sind unter den Genclustern dargestellt. Dabei steht TMD für Transmembrandomäne. Modifiziert nach (19)

2.3.1 Die Deletion des T7SS hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *B. subtilis* unter hochosmolaren Bedingungen

Um die physiologische Rolle des T7SS zu analysieren, wurde eine *yukE-yueD* Deletionsmutante durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette konstruiert und der daraus resultierende Stamm SLB284 genannt. Die Deletionsmutante wurde in einem vorläufigen Wachstumsexperiment unter hyperosmotischen Bedingungen kultiviert, dabei dienten der Wildtyp 168 und die *proHJ* Deletionsmutante

(TMB5) als Kontrollen. Dafür wurden zunächst Vorkulturen in SMM mit einer LB-Kultur angeimpft, welche dann über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Mit Hilfe dieser Vorkulturen wurden wiederum die Hauptkulturen angeimpft (OD_{578} 0,1). Die Hauptkulturen bestanden aus SMM mit 1,2 M NaCl. Diese Kulturen wurden bei 37°C für 24 Stunden im Wasserbad schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde der Wachstumsertrag in Form der OD_{578} photometrisch bestimmt. Das Ergebnis dieses Wachstumsexperiments ist in Abb. 24 dargestellt.

Unter hochosmolaren Bedingungen (1,2 M NaCl) erreichte der Wildtypstamm nach circa 20 Stunden seine maximale OD_{578} , die bei 4,0 lag. Die Deletionsmutante des T7SS erreichte bis zu diesem Zeitpunkt auch eine OD_{578} von circa 4,0. Bei beiden Stämmen sank danach die OD_{578} auf 3,0 ab. Im Gegensatz dazu erreichte die $\Delta proHJ$ Mutante auch nach 24 Stunden erst eine OD_{578} von 0,5. Unter den getesteten Bedingungen war kein Unterschied zwischen dem Wildtyp 168 und einer Mutante, die das Typ VII Sekretionssystem nicht mehr besitzt, feststellbar.

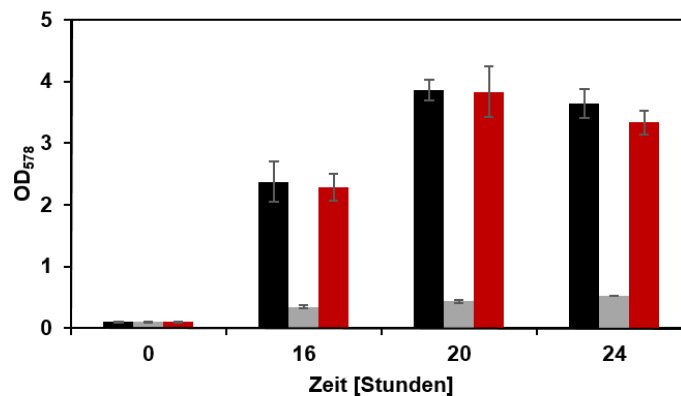


Abb. 24: Wachstumsanalyse der $\Delta yueE$ - $yueD$ Deletionsmutante

Abgebildet ist das Wachstum des Wildtyps 168 (schwarz), der $\Delta proHJ$ Mutante TMB5 (grau) und der T7SS Deletionsmutante SLB284 (dunkelrot). Die Zellen wurden in HMM mit der Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und die OD_{578} nach 16, 20 und 24 Stunden photometrisch festgehalten. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt, aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

2.3.2 Das T7SS ist salzinduzierbar und abhängig von DegU~P

Wie bereits in Abschnitt 2.2 des Ergebnisteils beschrieben wurde zu dem T7SS eine *treA* Fusion konstruiert um die Salzinduktion und die Abhängigkeit von DegU~P nachzuweisen. Hierfür wurde ein 560 bp langes Fragment vor das promotorlose *treA* Gen fusioniert. Dieses Fragment besteht aus 520 bp der stromaufwärts gelegenen Region des Translationsstarts von *yueE* und 40 bp der *yueE* 5'-kodierenden Region. Dieses Fusionskonstrukt wurde in den nicht essentiellen *amyE* Locus von *B. subtilis* über homologe Rekombination inseriert, daraus resultierte der Stamm SLB155. Außerdem wurde die *yueE*-*treA* Fusion noch mit dem $\Delta degSU$ Deletionsstamm (SLB172) und der DegU- und DegS-Hypermutable (SLB173 und SLB203) kombiniert, sodass der Einfluss des DegS-DegU TCS auf das T7SS nachgewiesen werden konnte.

Abb. 25 zeigt das Ergebnis des TreA-Enzymassays, bei dem Proben der Stämme SLB155, SLB172, SLB173 und SLB203 aus der exponentiellen Phase eingesetzt wurden, die in HMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl inkubiert wurden. Wie Abb. 25 zu entnehmen ist, wurde *yueE*-*treA* im Wildtyp auf

einem hohen Transkriptionsniveau exprimiert und eine Salzinduktion war nachweisbar. Sobald die *yukE-treA* Fusion in die *degSU* Deletionsmutante eingebracht wurde, nahm die Expression der Fusion unter isoosmotischen, sowie unter hyperosmotischen Bedingungen stark ab. Es war jedoch weiterhin eine Induktion durch Salz messbar. Ein interessantes Expressionsmuster zeigte sich, wenn die *yukE-treA* Fusion in die DegU- und DegS-Hypermutable eingebracht wurde. Unter ungestressten Bedingungen war eine Abhängigkeit der Expression von *yukE-treA* durch DegU~P detektierbar, da die Expression in beiden Hypermutablen um das Doppelte anstieg. Unter hyperosmotischen Bedingungen war das Gegenteil der Fall. Die Expression der Reporterfusion der DegU-Hypermutable fiel um die Hälfte ab und sank damit auf das Expressionsniveau von *yukE-treA* im Wildtyp unter isotonischen Bedingungen. In der DegS-Hypermutable sank die Aktivität sogar um das Vierfache und damit unter das Expressionsniveau von *yukE-treA* im Wildtyp unter isoosmotischen Bedingungen. Dieses Expressionsmuster lässt vermuten das DegU~P bei ungestressten Zellen an den Promotorbereich von *yukE* binden kann und so die Expression aktiviert. Weiterhin wird dadurch suggeriert, dass unter hyperosmotischen Bedingungen eine Veränderung von DegU~P selber oder der DegU~P Bindestelle stattfindet, die verhindert das DegU~P als Aktivator fungiert.

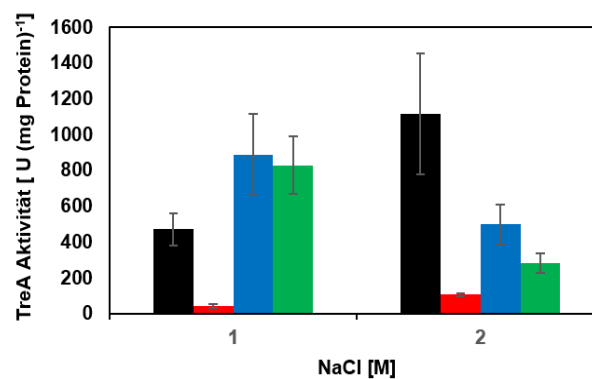


Abb. 25: Analyse der Promotoraktivität des *yukE-yueD* Operons

Gezeigt ist die Promotoraktivität der *yukE-treA* Wildtyp Fusion (SLB155, schwarz), sowie der Fusionsstämme SLB172 ($\Delta degSU$; rot), SLB173 [*degU32*(Hy), blau] und SLB203 [*degS200*(Hy), grün], die zuvor in HMM und HMM+1,2 M NaCl kultiviert wurden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

2.3.3 Die Expression des T7SS in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen

Um die Abhängigkeit des *yukE* Promotors von Salz näher zu untersuchen, wurde die Expression des Reportergenkonstrukts in Minimalmedium mit linear ansteigenden NaCl-Konzentrationen getestet. Hierfür wurde SLB155 in HMM mit NaCl von 0 M bis 1,2 M in 100 mM NaCl Schritten inkubiert und Zellen in der exponentiellen Phase geerntet. Diese Proben wurden anschließend im TreA-Aktivitätsassay vermessen.

Abb. 26 veranschaulicht, dass die Expression des *yukE* Promotors zunächst direkt proportional zur externen Osmolarität anstieg, aber bei einer Konzentration von 0,8 M NaCl seine maximale Expression von 1200 Units erreichte. Die TreA-Aktivität erreichte ab einer NaCl-Konzentration von 0,8 M ein Plateau und verweilte auf diesem, so dass auch die Erhöhung des osmotischen Reizes keine weitere Induktion herbeiführen konnte.

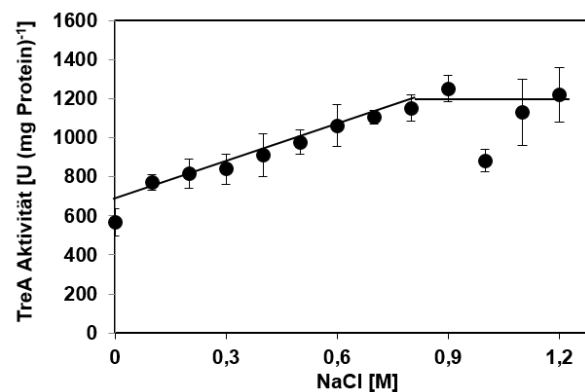


Abb. 26: Die Promotoraktivität von *yukE* in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen

Gezeigt ist die Promotoraktivität der *yukE-treA* Fusion im Wildtyp (SLB155, schwarz), welcher in Helmann Minimalmedium mit steigender Salzkonzentration (0 M NaCl – 1,2 M NaCl in 100 mM Schritten) kultiviert wurden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

2.3.4 Das T7SS wird durch osmotischen Stress induziert

yukE-treA wies eine starke Abhängigkeit von der Salzkonzentration im Medium auf. Dadurch stellte sich die Frage, ob die Expression von *yukE* spezifisch für NaCl war oder ob die Aktivierung durch eine osmotische Induktion im Allgemeinen erfolgte. Um diese Frage zu beantworten wurde der Einfluss verschiedener Substanzen auf *yukE-treA* getestet. SLB155 wurde dafür in HMM inkubiert, welches mit verschiedenen Konzentrationen an NaCl, KCl, Saccharose und Laktose versetzt wurde. Proben für die Bestimmung der TreA-Aktivität wurden während der exponentiellen Phase geerntet (Abb. 27). Die Endosmolarität der verschiedenen Medien betrug 1000 mosmol (kg Wasser)⁻¹, dies entspricht 0,4 M NaCl, 0,4 M KCl, 0,62 M Saccharose und 0,61 M Laktose.

Es wurde in diesem Experiment beobachtet, dass die Zugabe von allen Osmolyten eine erhöhte Expression von *yukE-treA* zur Folge hatte. Glycerin diente als Kontrolle, da es keine osmotisch aktive Substanz ist, jedoch die Osmolarität des Mediums erhöhen kann. Die Zugabe von Glycerin zeigte keine Induktion der Expression von *yukE-treA*. Das Induktionsniveau von NaCl entsprach dem im voran gegangenen Experiment gemessenen Induktionsniveau. Dieser Induktionsniveau wurde auch durch die Zugabe des anderen ionischen Osmolyts KCl erreicht. Ferner stellt Abb. 27 dar, dass die Zugabe von nicht ionischen Osmolyten einen sehr starken Effekt auf das Expressionsniveau hatten. Dieses Phänomen konnte bereits für den oben beschriebenen *degS* und *degU_{P3}* Promotoren sowie für die Promotoren von *opuA* und *proH* gezeigt werden (41, 134).

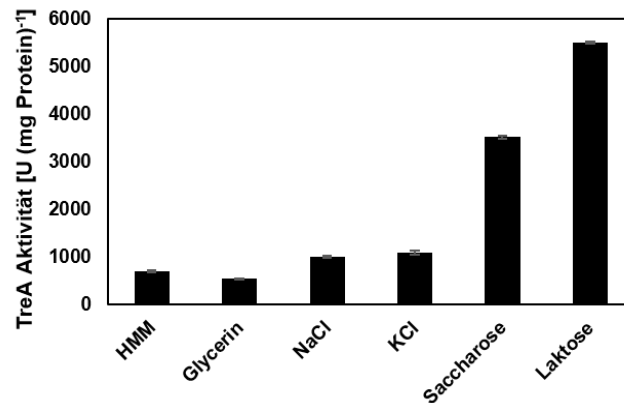


Abb. 27: Die Induzierbarkeit des *yukE* Promotors durch ionische und nicht ionische Stoffe

Die Zellen der *yukE-treA* Fusion SLB155 wurden bis zur exponentiellen Phase ($OD_{578} 1,5 \pm 0,2$) in HMM oder in HMM mit einer erhöhten Osmolarität inkubiert. Die erhöhte Osmolarität wurde durch die Zugabe von verschiedenen ionischen und nicht ionischen Stoffen erreicht, dabei beträgt die Osmolarität von HMM $250 \text{ mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ und die der Medien mit erhöhter Osmolarität $1000 \text{ mosmol (kg Wasser)}^{-1}$. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

2.3.5 Der Einfluss von Biofilmregulatoren auf die Expression des T7SS

B. subtilis ist in der Lage sich unter bestimmten Bedingungen von einer motilen Zelle in eine biofilmproduzierende Gemeinschaft zu entwickeln. Der Prozess der Biofilmbildung wird durch zwei Regulatoren, RemA und SinR, eingestellt. RemA ist der Aktivator der Biofilmbildung indem er die Promotorbereiche vor *tapA*, *epsA* und *slrR* bindet und deren Expression aktiviert. Im Gegensatz dazu ist SinR der Repressor für die Biofilmbildung, da er die Expression der drei genannten Gencluster inhibiert. Die Aktivität von SinR wird durch die Bindung von SinI und SlrA antagonisiert (zusammengefasst in (51) und Abb. 28).

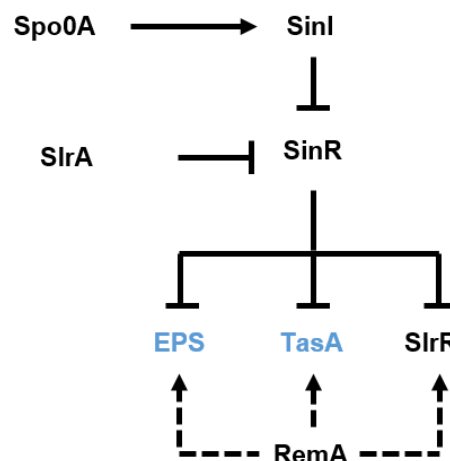


Abb. 28: Schematische Darstellung der Regulation der Biofilmbildung

Die Biofilmbildung wird in *B. subtilis* unter anderem durch den Repressor SinR und den Aktivator RemA kontrolliert. Dabei binden SinR und RemA an das *eps* Operon, an *tasA* und *slrR* und reprimieren oder aktivieren so dessen Expression. Die reprimierende Wirkung von SinR kann durch SinI und SlrA aufgehoben werden, indem beide Proteine an SinR binden und so dessen DNA Bindung inhibieren. Weiterhin spielt noch Spo0A eine Rolle, da Spo0A die Expression von SinI aktiviert. Die Expression des *eps* Operons und von *tasA* ist wichtig für die Ausbildung eines robusten Biofilms. In Blau sind die Matrixprodukte des Biofilm dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen an, dass die Regulation noch nicht komplett identifiziert wurde und dadurch indirekt oder direkt sein könnte. Modifiziert nach (108)

In der Tiling-Array Studie von Nicholas *et al.* (230) konnte nicht nur die Operonstruktur von Genclustern nachgewiesen werden, sondern es wurden 120 verschiedene Bedingungen genutzt um die Expression aller Gene in *B. subtilis* zu analysieren. Für das T7SS konnte eine Repression unter Biofilm-induzierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf wird nun ein möglicher Einfluss des Repressorproteins SinR und dessen Antagonist SinI, sowie des Aktivators RemA auf die Regulation des Genclusters aufgeführt (Abb. 29). Dafür wurde die *yukE-treA* Reportergenfusion in verschiedene genetische Hintergründe ($\Delta sinR$, $\Delta sinI$ und $\Delta remA$) eingebracht. Der Wildtyp Stamm SLB155 sowie die Deletionsstämme SLB279 ($\Delta sinR$), SLB274 ($\Delta sinI$) und SLB275 ($\Delta remA$) wurden in HMM und in HMM mit 1,2 M NaCl kultiviert, bei Eintritt in die mittlere exponentielle Phase ($OD_{578} 1,5 \pm 0,2$) geerntet und in den TreA-Enzymassay eingesetzt.

Unter isoosmotischen Bedingungen führte die Deletion von SinR (SLB279) zu einer erhöhten Expression des *yukE-yueD* Operons (Abb. 29), dahingegen führte die Deletion des SinR Antagonisten SinI (SLB274) und des Biofilmaktivators RemA (SLB275) zu einer Reduktion der Expression von *yukE-treA*. Unter hyperosmotischen Bedingungen war kein Unterschied zwischen dem $\Delta sinR$ Deletionsstamm SLB279 und dem Wildtyp SLB155 detektierbar. SLB274 ($\Delta sinI$) zeigt eine deutlich geringere Expression des T7SS, der Stamm SLB275 zeigte jedoch unter diesen Bedingungen eine leicht erhöhte Expression.

Dieses Expressionsmuster wies darauf hin, dass SinR unter normalen Bedingungen an die Promotorregion von *yukE* binden kann und so dessen Expression reprimiert. Diese Inhibition der Expression kann durch den Antagonisten SinI aufgehoben werden. Unter beiden getesteten Bedingungen wurde das Expressionsniveau des Wildtyps nicht erreicht, wenn SinI deletiert wurde. Weiterhin zeigte das Expressionsmuster, dass RemA unter normal physiologischen Bedingungen wahrscheinlich auch an den Promotorbereich von *yukE* binden kann und so dessen Expression aktiviert. Unter hyperosmotischen Bedingungen führte die Deletion von RemA aus bisher unbekannten Gründen zu einer Erhöhung des Expressionsniveaus von *yukE-treA*.

Letztendlich wurde auch noch der Einfluss des allgemeinen Stress-Sigmafaktors SigB auf die *yukE-treA* Promotoraktivität getestet, jedoch konnte weder unter normal physiologischen (0 M NaCl) noch unter hyperosmotischen Bedingungen (1,2 M NaCl) ein Unterschied festgestellt werden (Abb. 54).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das T7SS unter isoosmotischen Bedingungen sowohl durch DegU~P als auch durch SinI und RemA aktiviert wurde. Im Gegensatz dazu hatte SinR eine reprimierende Wirkung. Weiterhin konnte eine Salzinduktion des Operons ermittelt werden, die jedoch durch erhöhte Konzentrationen an DegU~P reprimiert wurde. Unter diesen hyperosmotischen Bedingungen konnte festgestellt werden, dass eine Deletion von RemA und SinR eine positive Wirkung auf die Expression von *yukE-treA* hat, die Deletion von SinI jedoch zu einer Reduktion der Expression führte.

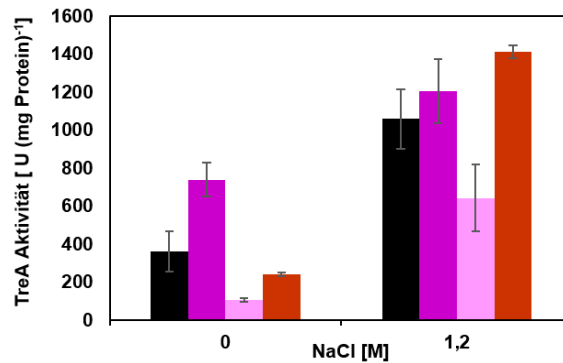


Abb. 29: Der Einfluss von Biofilmregulatoren auf die Expression des T7SS

Abgebildet ist die TreA-Aktivität von *B. subtilis* Kulturen, die in HMM \pm NaCl kultiviert wurde und Proben in der exponentiellen Phase gezogen wurden (OD_{578} $1,5 \pm 0,2$). Folgende Stämme wurden verwendet: SLB155 (Wildtyp, schwarz), SLB279 ($\Delta sinR$, lila), SLB274 ($\Delta sinI$, rosa) und SLB275 ($\Delta remA$, braun). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

3 Analyse des *yqiHIK* Operons in Abhängigkeit des DegS-DegU TCS

Während einer früheren Promotion wurde die Regulation des *yqiHIK* Operon bereits analysiert. Dabei stellte sich raus, dass die Expression von *yqiHIK* positiv durch den phosphorylierten Antwortregulator DegU reguliert wird. Interessanterweise taucht es aber in keiner der bisher publizierten Transkriptomstudien des DegU-Regulons auf (197, 241) und dadurch auch nicht in meinem Vergleich des DegU-Regulons mit dem Salz-Modulon (Tabelle 2). *yqiI* ist aber eines der am stärksten salzinduzierten Gene in drei verschiedenen Transkriptomdaten (172, 230, 299). Dieses Gen kodiert für eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase. *yqiI* wird in einem Operon mit *yqiH* und *yqiK* transkribiert (Abb. 10). *yqiH* kodiert für ein putativ extrazelluläres Lipoprotein und *yqiK* für eine putative zytoplasmatische Glycerophosphodiester Phosphodiesterase (YqiK). Das gereinigte Protein YqiI ist in der Lage *in vitro* Peptidoglykan zu spalten und durch ein N-terminales Signalpeptid wird es wahrscheinlich sekretiert.

Das Operon wird durch verschiedene Prozesse reguliert, so konnte zum einen, eine neue Antwort auf die Erhöhung der externen Salinität festgestellt werden. Dabei zeigte sich, dass eine Expression des *yqiHIK* Genclusters nur bei sehr hohen NaCl-Konzentrationen erfolgte ($> 0,7$ M NaCl). Die Expression wird dabei über einen SigA-abhängigen Promotor vermittelt (87). Weiterhin hat der Biofilmregulator SinR einen Einfluss auf die Expression des *yqiHIK* Genclusters (86). Für dieses Operon konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass unter hyperosmotischen Bedingungen das DegS-DegU TCS einen Einfluss hat, Während einer früheren Dissertation konnte das *yqiHIK* Operon als Ziel von dem Antwortregulator DegU~P identifiziert werden (86). Im Verlauf dieser Dissertation sollte nun die genaue Regulation des *yqiHIK* Operons durch DegU~P analysiert werden.

3.1 Das *yqiHIK* Operon ist salzinduzierbar und abhängig von DegU~P

Wie bereits erwähnt wurde der Einfluss des DegS-DegU TCS auf *yqiHIK* schon nachgewiesen (86). Während dieser Studie wurden die Deletionsmutante $\Delta degSU$ und die DegU-Hypermutable verwendet um die aktivierende Wirkung von DegU~P auf *yqiHIK* zu zeigen. Hierfür wurde ein 300 bp langes Fragment genutzt, welches sich aus 253 bp des stromaufwärts gelegenen Bereichs vor dem

Translationsstart sowie aus 43 bp des *yqiH* kodierenden Bereichs zusammensetzt. Dieses Wildtypfragment (im weiteren Verlauf auch als $\Delta 0$ bezeichnet) wurde vor ein promotorloses *treA* Gen fusioniert und über homologe Rekombination in den *amyE* Lokus von *B. subtilis* inseriert (KFB41). Das *degU32(Hy)* Mutantenallel zeigt in einigen Fällen einen negativen Einfluss auf das Zielgen, da das entstehende Protein nicht in der Lage ist mit SwrA zu interagieren. Diese Interaktion ist wichtig für einen positiven Einfluss von DegU~P auf einzelne Zielgene (218, 240). Um dieses Problem zu vermeiden wurde für die Analyse des *yqiHIK* Operons auch noch die DegS-Hypermutable verwendet. Diese Mutante führt durch den Verlust der Phosphataseaktivität von DegS auch zu einer erhöhten DegU~P Konzentration, ohne Auswirkungen auf das DegU Protein zu haben.

Um zu testen, ob es einen Unterschied zwischen der DegU-Hypermutable und der DegS-Hypermutable in Bezug auf die Expression von *yqiHIK* gibt wurden die Stämme in SMM und in SMM + 1,2 M NaCl kultiviert. In der mittleren exponentiellen Phase wurden Proben geerntet und diese anschließend in den TreA-Enzymtest eingesetzt. Hierbei wurden folgende Stämme mit der *yqiH-treA* Fusion verwendet: KFB41 (Wildtyp), KFB72 ($\Delta degSU$), KFB78 [*degU32(Hy)*] und SLB160 [*degS200(Hy)*]. Abb. 30 zeigt, dass *yqiHIK* im Wildtypintergrund salzinduzierbar war. Wurde jedoch das DegS-DegU TCS deletiert, befand sich die Expression auf einem Basalniveau und war auch nicht mehr osmotisch induzierbar. Durch die Einbringung der *yqiH-treA* Fusion in die DegU-Hypermutable wurde DegU~P als Aktivator für das *yqiHIK* Operon identifiziert, da unter beiden Bedingungen eine erhöhte Expression ermittelt wurde. Dieses Expressionsmuster konnte bereits gezeigt werden (86). In meiner Analyse konnte ein Unterschied zwischen der DegU-Hypermutable und der DegS-Hypermutable festgestellt werden. Die DegS-Hypermutable steigerte nochmal die Expression von *yqiHIK* unter hyperosmotischen Bedingungen um fast das Doppelte. Unter normal physiologischen Bedingungen (0 M NaCl) war kein Unterschied zwischen den Hypermutanten erkennbar.

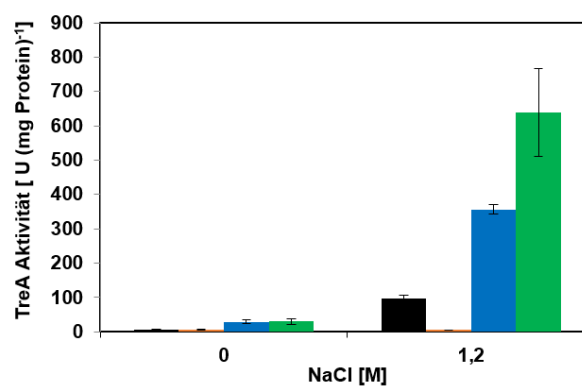


Abb. 30: Die Salzinduktion von *yqiHIK* und deren Abhängigkeit von dem DegS-DegU TCS

Gezeigt ist die TreA-Aktivität der *yqiH-treA* Fusion im Wildtyp (KFB41, schwarz), in der *degSU* Deletionsmutante KFB72 (rot), der DegU-Hypermutable KFB78 (blau) und der DegS-Hypermutable SLB160 (grün). Die Bestimmung der TreA – Aktivität erfolgte in SMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

Neben der Reporterogenanalyse wurde die Expression von *yqiHIK* noch auf mRNA Ebene durch einen Northern Blot bestätigt. In diesem Experiment konnte auch die Operonstruktur des *yqiHIK* Operons erneut erwiesen werden. Hierfür wurden Proben des Wildtyps 168, der DegS-Hypermutable SLB169 und

der $\Delta degSU$ Mutante SLB40 in der exponentiellen Phase gezogen, die in SMM und SMM + 1,2M NaCl kultiviert wurden. Aus diesen Proben wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit einer *yqiHIK* spezifischen Sonde hybridisiert um die Expression von *yqiHIK* nachzuweisen (Abb. 31 A). Als Kontrolle wurde die RNA aus dem $\Delta yqiHIK$ Stamm KFB8 isoliert und verwendet.

Abb. 31 zeigt das Ergebnis des Northern Blots, wobei drei mRNA-Spezies detektiert wurden. Alle drei Transkripte tauchten nicht in der *yqiHIK* Deletionsmutante auf, sodass von *yqiHIK* spezifischen Banden ausgegangen werden kann. Die Länge des größten Transkripts lag zwischen 1500 bp und 2000 bp und entspricht der kalkulierten Distanz (1801 bp) zwischen dem *yqiHIK* Promotor und einem stromabwärts gelegenen Transkriptionsterminator. Die Transkripte mit einer Länge von circa 1500 bp und circa 800 bp waren wahrscheinlich Abbauprodukte. Weitere Promotoren konnten in dem *yqiHIK* Operon durch bioinformatische Analysen sowie durch das Tiling-Array nicht ermittelt werden (230). Im Wildtyp konnte das *yqiHIK* Transkript nur unter hyperosmotischen Bedingungen detektiert werden, im Einklang mit dem Ergebnis, dass die Salzinduktion, die schon durch die Reportergeranalyse festgestellt wurde, bestätigt werden konnte. In der DegS-Hypermutable konnte unter beiden Bedingungen das *yqiHIK* Transkript detektiert werden, jedoch war die mRNA Menge unter isoosmotischen Bedingungen um ein Vielfaches schwächer als unter hyperosmotischen Bedingungen. In der $\Delta degSU$ Mutante konnte kein mRNA Transkript von *yqiHIK* detektiert werden, schlussfolgernd hängt die Expression von *yqiHIK* von DegS-DegU ab und zusätzlich wird die Expression durch erhöhte Mengen an DegU~P gesteigert.

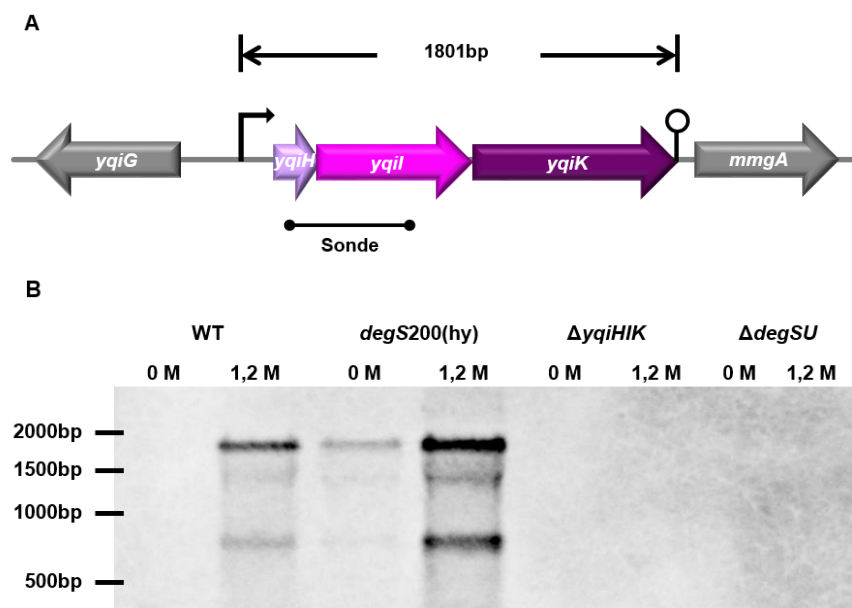


Abb. 31: Northern Blot Analyse des *yqiHIK* Operons

(A) Schematische Darstellung des *yqiHIK* Operons mit der Sonde für den Northern Blot und der kalkulierten Länge des *yqiHIK* Transkripts. (B) Northern Blot mit der *yqiHIK* spezifischen Sonde. Die Gesamt-RNA wurde aus den Stämmen Wildtyp 168, SLB169 [*degS200(Hy)*], KFB8 ($\Delta yqiHIK$) und SLB40 ($\Delta degSU$) isoliert, die in SMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert wurden. Anschließend wurde die RNA mit einer *yqiHIK* spezifischen Sonde hybridisiert. Die Gesamt-RNA für die Northern Blots wurde aus drei biologischen Parallelen der getesteten Stämme gezogen und analysiert. Abgebildet ist ein repräsentativer Northern Blot, der durch zwei weitere Northern Blot Analysen bestätigt wurde.

3.1.1 Erhöhte Konzentrationen an DegU~P führen zu einer linearen Salzabhängigkeit

Fischer und Bremer (87) bestimmten für *yqiHIK* bereits ein neues Expressionsmuster in Abhängigkeit der externen NaCl-Konzentration. Unterhalb einer Salzkonzentration von 0,7 M NaCl im Medium wurde *yqiH-treA* auf einem Basalniveau exprimiert. Erst bei Überschreitung dieser NaCl-Konzentration fand ein linearer Anstieg der Expression in Abhängigkeit der extrazellulären Salinität statt. Dieses Expressionsmuster konnte in der vorliegenden Arbeit auch für den *degU_{P3}* Promotor nachgewiesen werden. Jedoch änderte sich dessen Expressionsmuster sobald die Konzentration an DegU~P anstieg. Um zu ermitteln ob eine Erhöhung der DegU~P Konzentration einen Einfluss auf dieses Expressionsmuster von *yqiHIK* hat, wurden die Stämme KFB41 (Wildtyp), KFB78 (DegU-Hypermutable) und SLB160 (DegS-Hypermutable) in SMM mit ansteigender Salzkonzentration von 0 – 1,2 M NaCl inkubiert. In der mittleren exponentiellen Phase wurden Proben gezogen die anschließend im TreA-Enzymassay eingesetzt wurden. Abb. 32 stellt das Ergebnis dieses Salz-Ranges dar.

Für KFB41 konnte das bereits beschriebene Expressionsmuster bestätigt werden. Für die DegU-Hypermutable (KFB78) konnte eine lineare Korrelation zwischen der Osmolarität des Wachstumsmediums und der Expression von *yqiH-treA* gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnte für die DegS-Hypermutable (SLB160) nur eine lineare Abhängigkeit bis 0,8 M NaCl im Medium ermittelt werden. Ab dieser Konzentration erreichte die *yqiH-treA* Fusion ein Limit und blieb auch bei einem weiteren Anstieg der externen Osmolarität auf diesem Plateau.

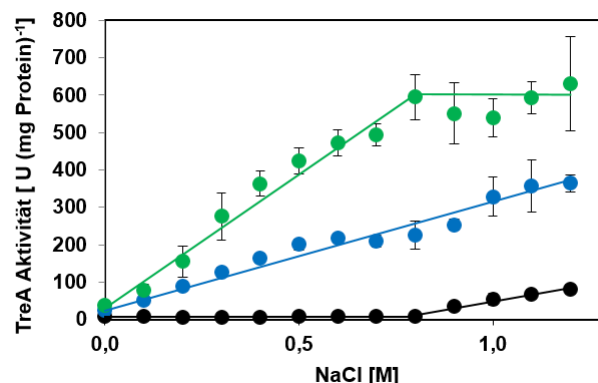


Abb. 32: Osmotische Kontrolle der *yqiHIK* Expression

Gezeigt ist die TreA-Aktivität der *yqiH-treA* Fusionsstämme KFB41 (Wildtyp schwarz), KFB78 [*degU32*(Hy), blau] und SLB160 [*degS200*(Hy), grün], die in SMM mit ansteigenden Salzkonzentrationen (0 M NaCl bis 1,2 M NaCl) inkubiert wurden. Proben für den TreA-Enzymtest wurden in der exponentiellen Phase gezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

3.2 Die stromaufwärts gelegene AT-reiche Region ist wichtig für die Expression von *yqiHIK*

Da der Einfluss von DegU~P auf die *yqiHIK* Expression eindeutig nachgewiesen werden konnte, war die nächste Frage wo der Antwortregulator DegU~P an *yqiHIK* bindet. Eine Literaturrecherche zeigte, dass DegU, unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus, an AT-reiche Sequenzabfolgen auf der DNA binden kann (240). Eine Analyse der Region vor dem Promotor zeigte eine AT-reiche Region die 124 bp stromaufwärts von der -35 Region des SigA-abhängigen Promotors von *yqiHIK* liegt (Abb. 33). Diese

Region ist 53 bp lang und hat einen GC-Gehalt von 19 % [*B. subtilis* hat einen GC-Gehalt von 43,5% (179)]. Dadurch kann man von einer möglichen DegU Bindestelle in dieser Region ausgehen. Um diese Bindestelle einzugrenzen, wurden sukzessive Verkürzungen dieser Region mit der DegU-Hypermutable kombiniert, um zu zeigen ab welcher Verkürzung die Expression von *yqiHIK* sinkt (Abb. 32 und Tabelle 4). Diese Verkürzungen wurden bereits im Wildtyp getestet und mit jeder weiteren Verkürzung sank die Expression von *yqiH-treA* ab, bis sich in der letzten Verkürzung nur noch ein Basalniveau feststellen lies (87). Die Verkürzung in der *yqiHIK* Promotorregion zeigte, dass die AT-reiche Region wichtig für die Aktivität und die osmotische Induktion des *yqiHIK* Operons ist.

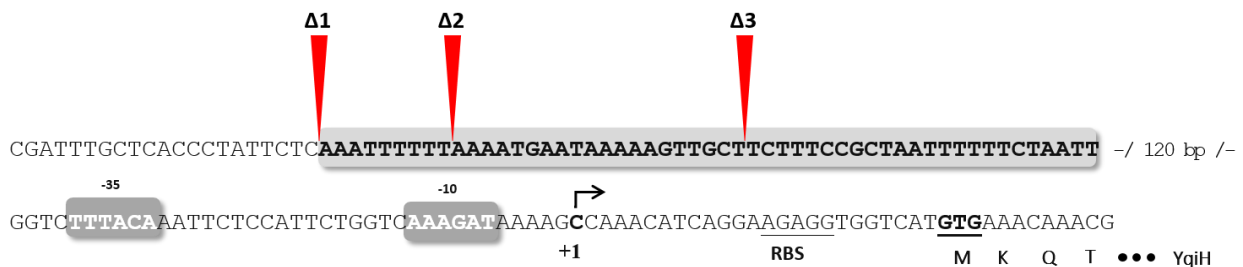


Abb. 33: Die AT-reiche Region von *yqiHIK*

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des 300 bp langen Wildtyp-Fragments ($\Delta 0$). Die Lage der Verkürzungen sind durch rote Pfeile markiert. Die hellgraue Box rahmt die AT-reiche Region ein. Außerdem sind der Transkriptions- und Translationsstart, sowie die -35 und -10 Region, als auch die Ribosomenbindestelle (RBS) eingezeichnet.

Durch die Kombination mit der DegU-Hypermutable sollte getestet werden ob auch eine stetige Abnahme der *yqiH-treA* Promotoraktivität stattfindet. Als Kontrolle wurden die Verkürzungen der AT-reichen Region mit der *degSU* Deletionsmutante kombiniert. Die Stämme der Verkürzungen im Wildtyp, der DegU-Hypermutable und der $\Delta degSU$ Mutante (Die Fusionsstämme sind in Tabelle 4 aufgelistet) wurden in SMM und in SMM- 1,2 M NaCl kultiviert und bei Eintritt in die exponentielle Phase ($OD_{578} 1,5 \pm 0,2$) wurden Proben für den TreA-Enzymtest gezogen.

Die Verkürzungen im Wildtyp konnten im Wesentlichen bestätigt werden. In der zweiten Verkürzung ($\Delta 2$) wurde, abweichend von den zuvor berichteten Daten (87), noch eine leichte Salzininduktion detektiert. Es fand aber immer noch eine schrittweise Verminderung der TreA-Aktivität statt, je weiter man die AT-reiche Region verkürzte. Betrachtet man die Expression der Verkürzungen in der $\Delta degSU$ Mutante war zu erkennen, dass in keiner Verkürzung eine *yqiH-treA* Aktivität messbar war. Das Wildtypfragment der *yqiH-treA* Fusion ($\Delta 0$) in der DegU-Hypermutable zeigte unter beiden Bedingungen eine erhöhte Expression, wie sie auch schon vorher gezeigt werden konnte. Verkürzte man das 300 bp Wildtypfragment um 21 bp fand in der DegU-Hypermutable bereits eine Reduktion der *yqiHIK* Promotoraktivität statt. Unter isoosmotischen Bedingungen verminderte sich die Expression um die Hälfte und unter hyperosmotischen Bedingungen nur um das 1,2-fache. Nahm man 9 weitere Nukleotide der AT-reichen Region weg, reduzierte sich die Expression von *yqiH-treA* in der DegU-Hypermutable enorm. Unter normal physiologischen Bedingungen sank die Promotoraktivität auf ein Basalniveau und unter hyperosmotischen Bedingungen reduzierte sich die Aktivität um das Siebenfache. Wurde die AT-reiche Region um die Hälfte verkürzt war sogar in der DegU-Hypermutable keine TreA-Aktivität mehr messbar. Daraus ließ sich folgern, dass zwischen der ersten und letzten Verkürzung die Bindestelle für DegU-P liegen muss.

Tabelle 4: Die AT-reiche Region von *yqiHIK* und ihre mögliche Rolle in der DegU~P Bindung

Fusionsstamm	Fragmentgröße und Bezeichnung	Hintergrund	TreA-Aktivität [U (mg Protein) ⁻¹] ^a	
			0 M NaCl	1,2 M NaCl
KFB41	300 bp ($\Delta 0$)	Wildtyp	7 \pm 3	81 \pm 27
SLB54	279 bp ($\Delta 1$)	Wildtyp	5 \pm 1	58 \pm 16
SLB55	270bp ($\Delta 2$)	Wildtyp	5 \pm 1	14 \pm 2
SLB56	250bp ($\Delta 3$)	Wildtyp	5 \pm 1	7 \pm 1
KFB78	300 bp ($\Delta 0$)	<i>degU32(Hy)</i>	99 \pm 1	420 \pm 44
SLB57	279 bp ($\Delta 1$)	<i>degU32(Hy)</i>	47 \pm 5	342 \pm 19
SLB58	270bp ($\Delta 2$)	<i>degU32(Hy)</i>	9 \pm 1	63 \pm 8
SLB59	250bp ($\Delta 3$)	<i>degU32(Hy)</i>	5 \pm 1	7 \pm 1
KFB72	300 bp ($\Delta 0$)	$\Delta degSU$	4 \pm 1	6 \pm 1
SLB60	279 bp ($\Delta 1$)	$\Delta degSU$	5 \pm 1	7 \pm 1
SLB61	270bp ($\Delta 2$)	$\Delta degSU$	6 \pm 1	7 \pm 1
SLB62	250bp ($\Delta 3$)	$\Delta degSU$	5 \pm 1	7 \pm 1

^aDie Stämme wurden in SMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert und in der exponentiellen Phase wurden Proben für den TreA-Enzymtest gezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

3.3 Identifizierung der DegU~P Bindestelle

Durch die Verkürzung der AT-reichen Region vor dem *yqiHIK* Promotor konnte die vermutete Bindestelle für DegU~P auf ein 50 bp langes Fragment eingegrenzt werden. Aus der Literatur geht nicht nur hervor, dass DegU an AT-reiche Regionen bindet, sondern genauer gesagt an AT-reiche Sequenzwiederholungen die aus Oktameren bestehen. Für verschiedene Zielgene wurde mittels Bandshift-Assays oder Reportergenstudien eine exakte DegU Bindestelle identifiziert, sodass eine Konsensussequenz ermittelt wurde (240). Diese sogenannte Konsensussequenz ist jedoch nicht sonderlich konserviert. Eine genauere Prüfung des eingegrenzten Fragments vor dem *yqiHIK* Promotor zeigte, dass mehrere Oktamere vor und in der AT-reichen Region existieren, die eine mögliche DegU Bindestelle darstellen. Da bei der zweiten Verkürzung ein erheblicher Verlust der Aktivität in der DegU-Hypermutable festgestellt wurde, liegt es nahe dass in der Nähe der zweiten Verkürzung eine Bindestelle mit einer hohen Affinität für DegU~P liegt. Die Überprüfung des 50 bp Fragments zeigte drei mögliche Bindestellen für DegU~P (Abb. 34). Daher wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt, in der zwei Nukleinbasen durch zwei andere Nukleotide ersetzt wurden. Hierbei wurde entweder das Purin Adenin durch das Purin Guanin und das Pyrimidin Thymin durch das Pyrimidin Cytosin ersetzt. Die erfolgten Mutationen sind in Abb. 34 dargestellt. Die Mutationen wurden in das Plasmid pKF13 eingebracht, welches die 300 bp lange *yqiH-treA* Fusion trägt. Die einzelnen Mutationen wurden noch untereinander kombiniert, sodass sieben Plasmide entstanden, die die verschiedenen Bindestellen für DegU mutiert haben. Die Fusionskonstrukte wurden in das Chromosom des Wildtyps 168, der $\Delta degSU$ Mutante, der DegU-Hypermutable und der DegS-Hypermutable inseriert. Die Plasmide sowie die daraus resultierten *B. subtilis* Stämme sind in Tabelle 16 aufgelistet. Die Fusionsstämme wurden in SMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und Aliquots wurden während der exponentiellen Phase

genommen. Diese Aliquots wurden anschließend eingesetzt um die TreA-Aktivität zu bestimmen (Tabelle 5).

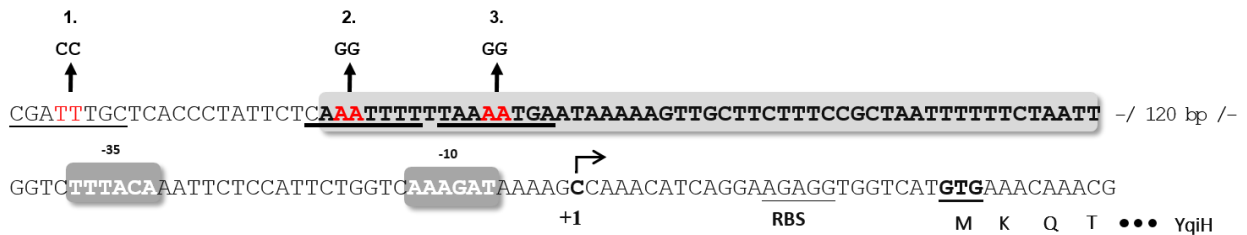


Abb. 34: Zielgerichtete Mutagenese der putativen DegU~P Bindestellen

(A) Abgebildet ist die Nukleotidsequenz des 300 bp langen Wildtyp Fragments. Die zu mutierenden Nukleotide sind in Rot gekennzeichnet und durch Pfeile sind die neuen Basen sowie die Bezeichnung der Mutation markiert. Die hellgraue Box rahmt die AT-reiche Region ein. Außerdem sind der Transkriptions- und Translationsstart, sowie die -35 und -10 Region, als auch die Ribosomenbindestelle (RBS) eingezeichnet.

Als Kontrolle wurde in diesem Experiment das 300 bp lange Wildtyp *yqiH-treA* Fusionsfragment in den diversen Hintergründen mitgeführt, bei dem sich das bisher bestimmte Expressionsverhalten bewahrheitete. Im Wildtyp KFB41 war eine erhöhte Expression unter hyperosmotischen Bedingungen messbar, die sich in den Hypermutable-Fusionsstämmen noch verstärkte. In diesen Stämmen war auch die Expression unter isoosmotischen Bedingungen erhöht. Deletierte man das DegS-DegU TCS war nur eine basale Aktivität von circa 5 Units messbar, die sich bei allen mutierten *yqiH-treA* Fusionskonstrukten nicht veränderte. Die zielgerichtete Mutagenese der ersten (SLB75, SLB182, SLB83 und SL267) und zweiten (SLB76, SLB183, SLB84 und SLB268) putativen Bindestelle von DegU führte zu keinem Unterschied in dem Expressionsmuster in den vier verschiedenen genetischen Hintergründen, sowohl unter isoosmotischen als auch unter hyperosmotischen Bedingungen. Eine Kombination beider mutierten Bindestellen (SLB198, SLB199, SLB200 und SLB272) führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Promotoraktivitäten. Im Gegensatz dazu führte die Mutation der dritten putativen Bindestelle zu einem Verlust der osmotischen Induktion des *yqiHIK* Operons im Wildtyp-Hintergrund (SLB195). Bestimmte man die Promotoraktivität dieses mutagenisierten *yqiH-treA* Fusionskonstruktes in den beiden Hypermutablen, stellte man fest, dass die Aktivität unter normal physiologischen Bedingungen auf ein Basalniveau absank. Unter hyperosmotischen Bedingungen sank die Promotoraktivität in der DegU-Hypermutable (SLB197) von 360 Units auf 14 Units ab und in der DegS-Hypermutable (SLB271) von 650 Units auf 29 Units. Dadurch war noch eine leichte Salzinduktion messbar. Eine Kombination der mutierten dritten Bindestelle mit den anderen beiden putativen Bindestellen änderte nichts an der Reduktion der Promotoraktivität. In allen Fällen war in den Hypermutablen trotzdem noch eine leichte Salzinduktion detektierbar, diese war aber im Wildtyp nicht vorhanden.

Tabelle 5: Zielgerichtete Mutagenese der putativen DegU~P Bindestellen

Fusionsstamm	Mutation	Hintergrund	TreA-Aktivität [U (mg Protein) ⁻¹] ^a	
			0 M NaCl	1,2 M NaCl
KFB41	Wildtyp	Wildtyp	8 ± 2	83 ± 27
KFB72	Wildtyp	$\Delta degSU$	6 ± 2	5 ± 1
KFB78	Wildtyp	<i>degU32</i> (Hy)	35 ± 1	361 ± 5
SLB160	Wildtyp	<i>degS200</i> (Hy)	23 ± 1	652 ± 41
SLB75	1 BS	Wildtyp	4 ± 1	106 ± 17
SLB182	1 BS	$\Delta degSU$	3 ± 0	5 ± 1
SLB83	1 BS	<i>degU32</i> (Hy)	85 ± 6	369 ± 35
SLB267	1 BS	<i>degS200</i> (Hy)	45 ± 3	678 ± 66
SLB76	2.BS	Wildtyp	4 ± 0	81 ± 24
SLB183	2.BS	$\Delta degSU$	5 ± 1	6 ± 0
SLB84	2.BS	<i>degU32</i> (Hy)	85 ± 3	374 ± 12
SLB268	2.BS	<i>degS200</i> (Hy)	33 ± 2	628 ± 19
SLB195	3 BS	Wildtyp	4 ± 1	6 ± 1
SLB196	3 BS	$\Delta degSU$	5 ± 1	7 ± 0
SLB197	3 BS	<i>degU32</i> (Hy)	5 ± 0	14 ± 1
SLB271	3 BS	<i>degS200</i> (Hy)	4 ± 0	29 ± 2
SLB198	1. und 2. BS	Wildtyp	4 ± 1	74 ± 21
SLB199	1. und 2. BS	$\Delta degSU$	5 ± 0	5 ± 0
SLB200	1. und 2. BS	<i>degU32</i> (Hy)	54 ± 5	344 ± 48
SLB272	1. und 2. BS	<i>degS200</i> (Hy)	25 ± 2	623 ± 42
SLB220	1. und 3. BS	Wildtyp	4 ± 1	7 ± 1
SLB276	1. und 3. BS	$\Delta degSU$	4 ± 1	6 ± 0
SLB277	1. und 3. BS	<i>degU32</i> (Hy)	5 ± 1	12 ± 2
SLB278	1. und 3. BS	<i>degS200</i> (Hy)	4 ± 1	23 ± 5
SLB152	2. und 3. BS	Wildtyp	4 ± 1	6 ± 1
SLB165	2. und 3. BS	$\Delta degSU$	4 ± 0	9 ± 3
SLB166	2. und 3. BS	<i>degU32</i> (Hy)	5 ± 2	11 ± 2
SLB270	2. und 3. BS	<i>degS200</i> (Hy)	3 ± 0	21 ± 5
SLB144	alle mutiert	Wildtyp	5 ± 1	5 ± 0
SLB163	alle mutiert	$\Delta degSU$	4 ± 0	4 ± 1
SLB164	alle mutiert	<i>degU32</i> (Hy)	4 ± 1	11 ± 2
SLB269	alle mutiert	<i>degS200</i> (Hy)	4 ± 1	16 ± 1

^a Die Stämme wurden in SMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert, Proben wurden in der mittleren exponentiellen Phase geerntet und anschließend in den TreA-Aktivitätstest eingesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet. BS steht für Bindestelle.

Die Mutagenesestudie zeigte, dass die dritte putative Bindestelle, die sich in der Schnittstelle der zweiten AT-Verkürzung befindet, die Bindestelle mit der höchsten Affinität für DegU~P ist. Auf Grund der vorhandenen TreA-Aktivität der mutierten dritten Bindestelle in den Hypermutanten ist davon

auszugehen, dass DegU~P noch an einer anderen Stelle mit niedrigerer Affinität binden kann. Diese Hypothese wird dadurch untermauert, dass bekannt ist, dass DegU~P an Sequenzwiederholungen bindet. Eine Zusammenführung der drei möglichen Bindestellen zeigte jedoch keine Veränderung in der Promotoraktivität. Demnach muss in der AT-reichen Region noch eine weitere DegU~P Bindestelle liegen. Diese wurde während der Mutagenesestudie nicht abgedeckt, sodass in den Hypermutanten unter hyperosmotischen Bedingungen noch eine leichte Expression stattfindet, obwohl die dritte Bindestelle mutiert wurde.

3.4 Ein großer Abstand zwischen der DegU~P Bindestelle und dem SigA – abhängigen Promotor ist nötig für die *yqiHIK* Expression

Die detaillierte Analyse von *sacB* und *aprE* als Zielgene von DegU~P zeigten, dass DegU~P an AT-reiche Oktamere bindet, die in einer direkten Sequenzwiederholung zu einander liegen (sogenannte head-to-tail Sequenzwiederholungen) (288, 313). Während dieser Analysen konnte auch festgestellt werden, dass DegU~P in einem gewissen Abstand zum Transkriptionsstart der jeweiligen Gene bindet. So wurde für *aprE* eine Distanz von 71 bp bestimmt und für *sacB* ein Abstand von 113 bp. Die durchgeführte Mutagenesestudie, sowie die Verkürzung der AT-reichen Regionen des *yqiHIK* Promotors zeigten, dass die DegU~P Bindestelle in einem signifikanten Abstand zum SigA-abhängigen Promotor liegt. Durch diese Analysen konnte ein Abstand von 203 bp von der DegU~P Bindestelle zum Transkriptionsstart bestimmt werden. Diese großen Abstände zwischen der Bindestelle des Transkriptionsregulators und dem Transkriptionsstart deuten darauf hin, dass diese Distanz eine wichtige Rolle spielt. Eine solche Distanz könnte nötig sein um die DNA zu beugen, sodass der Regulator daraufhin in Kontakt mit der RNA-Polymerase gelangt um die Transkription zu aktivieren (257, 325).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden verschiedene Bereiche zwischen der DegU~P Bindestelle und dem Transkriptionsstart von *yqiH* deletiert. Zum einen wurde die Distanz von 203 bp auf 129 bp ($\Delta 74$ bp) verkürzt. Durch weitere Verkürzungen auf 94 bp ($\Delta 109$ bp) und auf 70 bp ($\Delta 133$ bp) wurde die Distanz noch weiter verringert (Abb. 35 A und Tabelle 16). Der Wildtyp-Fusionsstamm KFB41 ($\Delta 0$), sowie die Stämme SLB287 ($\Delta 133$ bp), SLB291 ($\Delta 109$ bp) und SLB295 ($\Delta 74$ bp) wurden in SMM ohne und mit der Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und von diesen Stämmen wurden in der mittleren exponentiellen Phase Proben gezogen. Diese Proben wurden anschließend in den TreA-Enzymtest eingesetzt. Die Ergebnisse sind Abb. 35 B zu entnehmen.

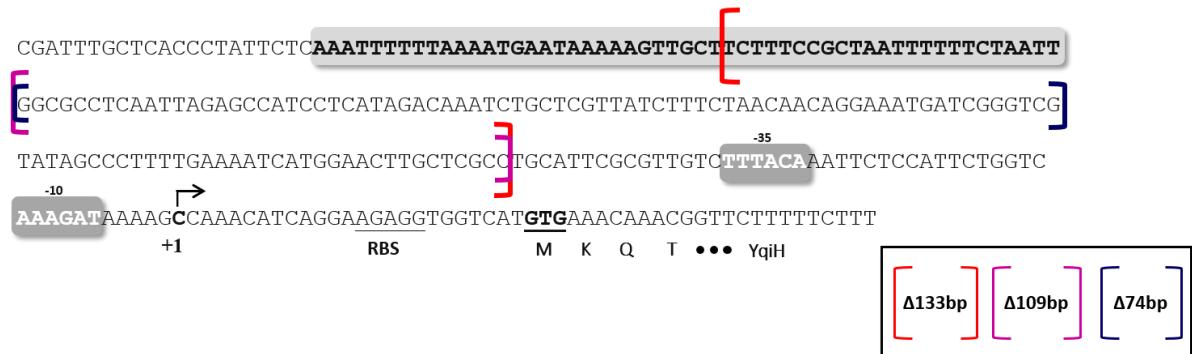
Bereits eine Verkürzung des Bereiches zwischen der DegU Bindestelle und dem Transkriptionsstart von 203 bp auf 131 bp zeigte, dass der *yqiHIK* Promotor nicht mehr durch eine Erhöhung der externen Osmolarität induziert wurde. Das Expressionsniveau sank auf ein Basalniveau. Die Analyse weitere Verkürzungen (SLB291 und SLB287), die den Transkriptionsregulator näher an den Transkriptionsstart bringen würden, führten auch zu einem Verlust der osmotischen Induktion des *yqiHIK* Operons. Die Einbringung der Verkürzungen in den Deletionsstamm des DegS-DegU TCS [KFB72 ($\Delta 0$) sowie die Stämme SLB297 ($\Delta 133$ bp), SLB293 ($\Delta 109$ bp) und SLB289 ($\Delta 74$ bp)] führte wie bisher zu einer basalen Expression des *yqiHIK* Operons.

Letztendlich wurden die Verkürzungen der intergenen Region noch mit der DegU-Hypermutante und der DegS-Hypermutante zusammengeführt. Die daraus resultierenden Stämme sind in Abb. 35 B aufgelistet.

Die Wildtyp *yqiH-treA* Fusion diente als Kontrolle und zeigte, dass die Hypermutanten die Expression sowohl unter normal physiologischen, als auch unter hyperosmotischen Bedingungen stark erhöhten. Verkürzte man aber nun den Bereich, egal um wie viele Nukleotide, konnte die Expression von *yqiH* durch die Hypermutanten nicht mehr erhöht werden. Die Expression in allen Stämmen sank unter beiden getesteten Bedingungen auf ein Basalniveau herab.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Länge des Bereichs zwischen der DegU~P Bindestelle und dem SigA-abhängigen Promotor essentiell für eine korrekte Expression des *yqiHIK* Operons ist.

A



B

Fusionsstamm	Fragmentlänge der Deletion	Hintergrund	TreA-Aktivität [U (mg Protein) ⁻¹]	
			0 M NaCl	1,2 M NaCl
KFB41	0	Wildtyp	5 ± 0	106 ± 12
SLB295	Δ74 bp	Wildtyp	5 ± 1	7 ± 1
SLB291	Δ109 bp	Wildtyp	5 ± 1	7 ± 1
SLB287	Δ133 bp	Wildtyp	4 ± 1	5 ± 0
KFB72	0	Δ <i>degSU</i>	4 ± 0	5 ± 0
SLB296	Δ74 bp	Δ <i>degSU</i>	4 ± 1	6 ± 1
SLB292	Δ109 bp	Δ <i>degSU</i>	5 ± 1	7 ± 1
SLB288	Δ133 bp	Δ <i>degSU</i>	4 ± 1	5 ± 1
KFB78	0	<i>degU32</i> (Hy)	33 ± 2	386 ± 10
SLB297	Δ74 bp	<i>degU32</i> (Hy)	4 ± 1	6 ± 1
SLB293	Δ109 bp	<i>degU32</i> (Hy)	5 ± 0	7 ± 0
SLB289	Δ133 bp	<i>degU32</i> (Hy)	4 ± 1	6 ± 1
SLB160	0	<i>degS200</i> (Hy)	22 ± 1	679 ± 9
SLB298	Δ74 bp	<i>degS200</i> (Hy)	4 ± 0	8 ± 1
SLB294	Δ109 bp	<i>degS200</i> (Hy)	5 ± 0	7 ± 1
SLB290	Δ133 bp	<i>degS200</i> (Hy)	4 ± 1	5 ± 0

Abb. 35: Der Einfluss der Verkürzungen der intergene Region auf die *yqiH-treA* Fusion

(A) Abgebildet ist die Nukleotidsequenz des 300 bp langen Wildtyp Fragments. Die Verkürzungen sind durch verschieden farbige eckige Klammern markiert. Die hellgraue Box rahmt die AT-reiche Region ein. Außerdem sind der Transkriptions- und Translationsstart, sowie die -35 und -10 Region, als auch die Ribosomenbindestelle (RBS) eingezeichnet. (B) Tabellarische Aufstellung der Ergebnisse des TreA-Enzymassays der *yqiH-treA* Reporterfusion. Die Stämme, die Länge der Verkürzung und der Stammhintergrund sind in der Tabelle aufgeführt. Die Stämme wurden in SMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert, Proben wurden in der mittleren exponentiellen Phase geerntet und anschließend in den TreA-Aktivitätstest eingesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

3.5 Zielgerichtete Mutagenese des SigA-abhängigen Promotors des *yqiHIK* Operons

Die bisherigen Daten in dieser Studie suggerieren, dass das DegS-DegU TCS zu einer Aktivierung des Genclusters unter hyperosmotischen Bedingungen führt. Ein Indikator dafür war die basale Expression des *yqiHIK* Promotors unter hyperosmotischen Bedingungen, wenn das DegS-DegU TCS im Chromosom von *B. subtilis* deletiert wurde. Es besteht aber die Möglichkeit, dass DegS-DegU *yqiHIK* aktiviert und die Salzinduktion unabhängig von dem DegS-DegU TCS stattfindet. Durch die Deletion des TCS fehlt die Aktivierung, sodass die Salzinduktion nicht messbar ist. Um dieser Hypothese nachzugehen wurden Reportergenkonstrukte von *yqiH-treA* genutzt, die Mutationen im SigA-abhängigen Promotor aufweisen. Der Vergleich des osmotisch induzierten *yqiHIK* Promotors mit der Konsensussequenz von SigA-abhängigen Promotoren (124) zeigte einige Sequenzabweichungen (Tabelle 6). Durch schrittweise gezielte Mutagenese in Richtung der perfekten Konsensussequenz des SigA-abhängigen Promotors konnte gezeigt werden, dass die Verbesserungen zum SigA-abhängigen Promotor das Expressionsniveau des *yqiHIK* Operons deutlich steigern (87). Weiterhin blieb eine Salzinduktion bestehen. Jedoch führte ein perfekter SigA-abhängiger Promotor zum Verlust der osmotischen Induktion des Genclusters. Durch das erhöhte Transkriptionsniveau dieser Mutanten sollte nun getestet werden, ob durch die Deletion des DegS-DegU TCS noch eine Salzinduktion des *yqiHIK* Operons messbar ist. Es wird vermutet, dass durch die SigA-Konsensusmutanten eine Expression unter hyperosmotischen Bedingungen des *yqiHIK* Genclusters auch in Abwesenheit von DegS-DegU stattfindet. Um diese Hypothese zu verifizieren wurden die SigA-Promotormutanten zum einen in den $\Delta degSU$ Deletionsstamm, sowie in die Hypermutanten-Hintergründe eingebracht. Durch die Hypermutanten sollte gezeigt werden, ob das erhöhte Expressionsniveau der SigA-Promotormutanten noch weiter gesteigert werden kann. Alle hieraus resultierten Stämme sind in Tabelle 6 und Tabelle 16 aufgelistet und wurden in SMM sowie in SMM mit 1,2 M NaCl kultiviert. Die Proben für den TreA-Aktivitätsassay wurden in der exponentiellen Phase geerntet.

Die Wildtyp *yqiH-treA* Fusion zeigte im Wildtyp-Hintergrund (KFB41) sowie in dem $\Delta degSU$ (KFB72) Hintergrund unter isotonischen Bedingungen nur eine basale Aktivität. Diese Aktivität ließ sich im Wildtyp durch Kultivierung in hypertonem Medium steigern, aber nicht in der $\Delta degSU$ Mutante. Durch die Analyse der DegU-Hypermutante (KFB78) wurde ein Anstieg der Expression um den Faktor 14 unter normal physiologischen Bedingungen und um den Faktor 4 unter hyperosmotischen Bedingungen erreicht. In der DegS-Hypermutante (SLB160) stieg die Salzinduktion des Operons von Faktor 16 auf Faktor 21 an (Tabelle 6).

Das konservierte invariante T in der -10 Region des SigA-abhängigen Promotors ist essentiell für die Funktionalität dieses Promotors (124). Durch die Mutagenesestudie konnte dies bereits bestätigt werden, da ein Austausch des „T“ zu einem „G“ (KFB33) dazu führt, dass der *yqiHIK* Promotor nur noch auf einem Basalniveau von 5 Units unter beiden Wachstumsbedingungen exprimiert wurde. Dieses Expressionsverhalten änderte sich nicht, wenn man diese Promotormutante in den $\Delta degSU$ Hintergrund (SLB39) oder in die DegU- (SLB46) und DegS-Hypermutante (SLB286) einbrachte (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zielgerichtete Mutagenese des SigA-abhängigen *yqiHIK* Promotors in Abhängigkeit des DegS-DegU TCS

Fusionsstamm	Mutation	SigA-Promotor			Hintergrund	TreA-Aktivität [U (mg Protein) ⁻¹]		Induktionsfaktor ^b
		-35	-16	-10		0 M NaCl	1,2 M NaCl	
		TTGACA	TG	TATAAT ^a				
KFB15	Wildtyp	TTTACA	GT	AAAGAT	Wildtyp	5 ± 0	75 ± 22	16,0
SLB35		TTTACA	GT	AAAGAT	$\Delta degSU$	5 ± 1	6 ± 2	1,4
SLB41		TTTACA	GT	AAAGAT	<i>degU32</i> (Hy)	69 ± 17	322 ± 65	4,7
SLB160		TTTACA	GT	AAAGAT	<i>degS200</i> (Hy)	30 ± 9	639 ± 129	21,4
KFB33	Mutation des invarianten Ts	TTTACA	GT	AAAGAG	Wildtyp	5 ± 1	5 ± 1	1,1
SLB39		TTTACA	GT	AAAGAG	$\Delta degSU$	4 ± 0	5 ± 1	1,2
SLB46		TTTACA	GT	AAAGAG	<i>degU32</i> (Hy)	4 ± 1	7 ± 2	1,6
SLB286		TTTACA	GT	AAAGAG	<i>degS200</i> (Hy)	7 ± 0	6 ± 0	0,8
KFB24	Mutation der -35 Region	TGTACA	GT	AAAGAT	Wildtyp	10 ± 0	130 ± 22	13,0
SLB36		TGTACA	GT	AAAGAT	$\Delta degSU$	9 ± 1	20 ± 2	2,3
SLB42		TGTACA	GT	AAAGAT	<i>degU32</i> (Hy)	257 ± 24	519 ± 110	2,0
KFB26	Mutation der -10 Region	TTTACA	GT	AAAAT	Wildtyp	5 ± 0	120 ± 22	23,1
SLB37		TTTACA	GT	AAAAT	$\Delta degSU$	5 ± 0	7 ± 1	1,4
SLB44		TTTACA	GT	AAAAT	<i>degU32</i> (Hy)	151 ± 17	469 ± 55	3,1
KFB32	Perfekte -10 Region	TTTACA	GT	TATAAT	Wildtyp	249 ± 38	568 ± 71	2,3
SLB38		TTTACA	GT	TATAAT	$\Delta degSU$	264 ± 19	615 ± 74	2,3
SLB45		TTTACA	GT	TATAAT	<i>degU32</i> (Hy)	333 ± 47	611 ± 83	1,8
KFB34	Perfekte -35 und -10 Region	TGTACA	GT	TATAAT	Wildtyp	399 ± 47	713 ± 123	1,8
SLB27		TGTACA	GT	TATAAT	$\Delta degSU$	432 ± 37	924 ± 106	2,1
SLB47		TGTACA	GT	TATAAT	<i>degU32</i> (Hy)	378 ± 34	521 ± 77	1,4
KFB25	Mutation der -16 Region	TTTACA	TG	AAAGAT	Wildtyp	23 ± 8	288 ± 78	12,4
SLB26		TTTACA	TG	AAAGAT	$\Delta degSU$	38 ± 7	150 ± 8	3,9
SLB43		TTTACA	TG	AAAGAT	<i>degU32</i> (Hy)	340 ± 45	693 ± 79	2,0
SLB202		TTTACA	TG	AAAGAT	<i>degS200</i> (Hy)	246 ± 4	1135 ± 138	4,6
KFB35	Perfekter SigA-Promotor	TGTACA	TG	TATAAT	Wildtyp	360 ± 40	450 ± 95	1,2
SLB28		TGTACA	TG	TATAAT	$\Delta degSU$	379 ± 70	777 ± 167	2,1
SLB48		TGTACA	TG	TATAAT	<i>degU32</i> (Hy)	270 ± 38	249 ± 72	0,9

^a Konsensus-Sequenz des SigA-abhängigen Promotors^b Der Induktionsfaktor wurde durch den Quotienten aus TreA-Aktivität in SMM-1,2 M NaCl/ TreA-Aktivität in SMM ermittelt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

Die gerichtete Mutagenese wurde schrittweise durchgeführt, sodass zunächst die -35 Region zum perfekten SigA-Promotorkonsensus mutiert wurde. Die Analyse der TreA-Aktivität ergab im Wildtyp (KFB24) eine Verdopplung der Promotoraktivität unter beiden getesteten Bedingungen. In der $\Delta degSU$ Mutante (SLB36) verringerte sich die Expression unter hyperosmotischen Bedingungen auf 20 Units. Es ließ sich aber dennoch eine 2,3-fache Salzinduktion ermitteln. Durch die Einbringung dieser Promotormutante in die DegU-Hypermutable wurde die Expression unter isoosmotischen Bedingungen um den Faktor 25 und unter hyperosmotischen Bedingungen um den Faktor 5 angehoben. Eine zweifache Salzinduktion konnte festgestellt werden (Tabelle 6).

Der nächste Schritt der Mutagenese befasste sich mit der -10 Region, in die zunächst eine einzelne Punktmutation eingebracht wurde (Tabelle 6). Die Bestimmung der Promotoraktivität im Wildtyp-Hintergrund (KFB26) zeigte, dass die Salzinduktion von Faktor 16 (KFB15) auf Faktor 23 angehoben wurde. Im Gegensatz dazu konnte in dem $\Delta degSU$ Stamm (SLB37) nur eine basale Promotoraktivität unter beiden Wachstumsbedingungen festgestellt werden. In der DegU-Hypermutable konnte die Expression unter beiden Bedingungen gesteigert werden und daraus berechnete sich eine Salzinduktion mit einem Faktor von 3,1.

Zwei weitere Punktmutationen in der -10 Region führten zu einer perfekten -10 Region (KFB32) und einer deutlichen Erhöhung der Expression unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Promotoraktivität stieg von 75 Units (KFB15) auf ungefähr 570 Units (KFB32) an. Diese Verbesserung der Promotoraktivität fand auch durch ungestresste Bedingungen statt, wodurch die Salzinduktion von Faktor 16 (KFB15) auf Faktor 2 (KFB32) absank. Diese Promotoraktivitäten wurden sowohl in dem $\Delta degSU$ Stamm (SLB38) und der DegU-Hypermutable (SLB45) determiniert (Tabelle 6).

Ein ähnliches Muster konnte bei der Zusammenführung der perfekten -35 und -10 Region (KFB34) eruiert werden. Sowohl im Wildtyp, der $\Delta degSU$ Mutante (SLB27) und DegU-Hypermutable (SLB47) wurde eine Erhöhung der Promotoraktivität unter physiologischen und hyperosmotischen Bedingungen festgestellt. Im Wildtyp führte dieser mutierte SigA-abhängige Promotor zu einer Verringerung der Salzinduktion von 16-fach (KFB15) auf 1,8-fach (KFB34). In der $\Delta degSU$ Mutante (SLB27) konnte immer noch eine Salzinduktion mit einem Faktor von 2 berechnet werden, der wiederum in der DegU-Hypermutable auf 1,4-fach (SLB47) sank (Tabelle 6).

Das TG Motiv der -16 Region spielt eine entscheidende Rolle bei der Funktion als auch bei der Stärke von SigA-abhängigen Promotoren (87, 324). Der *yqiHIK* Promotor besitzt anstelle des TG Motivs ein GT. Fischer (87) führte eine Mutation ein um das charakteristische TG Motiv wieder herzustellen. Die Salzinduktion dieser Mutante (12-fach in KFB25) war ähnlich der des Wildtyps (16-fach in KFB15), fand jedoch auf einem höheren Expressionsniveau statt (Tabelle 6). Unter beiden Bedingungen vervierfachte sich die Expression. Durch die Deletion des DegS-DegU TCS (SLB26) verringerte sich die Expression unter hyperosmotischen Bedingungen um die Hälfte im Vergleich zu der Promotormutante im Wildtyp (KFB25). Die Expression unter ungestressten Bedingungen verringerte sich nicht, sodass die Salzinduktion von Faktor 12 (KFB25) auf Faktor 4 (SLB26) verringert wurde. In der DegU-Hypermutable verbesserte sich die Expression der Promotormutante (SLB43) unter normal physiologischen Bedingungen um das 15-fache und unter hyperosmotischen Bedingungen um das 2,5-fache. Dadurch wurde zwar die Promotoraktivität durch erhöhte DegU~P Konzentrationen gesteigert, aber die Salzinduktion sank von Faktor 12 (KFB25) auf Faktor 2 (SLB43) ab. Die Einbringung der -16 Region

Mutante in die DegS-Hypermutable (SLB202) erbrachte unter hyperosmotischen Bedingungen die stärkste Expression aller getesteten Stämme. Durch die Bestimmung der TreA-Aktivität wurden circa 1000 Units ermittelt. Unter isoosmotischen Bedingungen stieg die Promotoraktivität um das Zehnfache an, sodass eine Salzinduktion des *yqiHIK* Promotors in SLB202 mit dem Faktor 5 berechnet wurde.

Der letzte Schritt der Mutagenesestudie war die Zusammenführung aller Mutationen um einen perfekten SigA-abhängigen Promotor zu konstruieren (KFB35). Der perfekte Promotor wurde zwar auf einem hohen Niveau exprimiert, jedoch konnte er nicht mehr länger osmotisch induziert werden. Der $\Delta degSU$ Deletionsstamm (SLB28) zeigte eine ähnliche Promotoraktivität wie der Wildtyp (KFB35). Die Kombination des perfekten SigA-Promotors und der DegU-Hypermutable führte zu keiner weiteren Erhöhung der Expression, sondern aus bisher ungeklärten Gründen zu einer Verringerung der Expression. Unter normal physiologischen Bedingungen wurden im Wildtyp Units von circa 350 erreicht, in der Hypermutable lagen diese bei 270 Units. Unter hyperosmotischen Bedingungen wurden in KFB35 ungefähr 450 Units erreicht, diese halbierten sich in der Hypermutable auf circa 250 Units (Tabelle 6).

Grundsätzlich konnte durch die Mutagenesestudie im Wildtyp bereits gezeigt werden, dass die Abweichungen des *yqiHIK* Promotors von der Konsensussequenz des SigA-abhängigen Promotor dazu dienen das Expressionsniveau unter normalen physiologischen Bedingungen gering zu halten. Durch die Verbesserung des Promotors hin zum perfekten Promotor wurde das Expressionsniveau unter beiden Wachstumsbedingungen unverkennbar verstärkt. Durch die Zusammenbringung der Promotormutanten mit den Hypermutanten wurde das Expressionsniveau noch weiter gesteigert. Weiterhin zeigte dieses Experiment, dass die Deletion des DegS-DegU TCS einen Einfluss auf das Expressionsniveau von *yqiHIK* hatte, aber immer noch eine Salzinduktion messbar war.

3.6 Der Einfluss einer membrangebundenen Sensorkinase DegS auf die Expression des *yqiHIK* Genclusters

Ein weiteres Experiment wurde durchgeführt, um zu demonstrieren, dass DegS nicht der bisher postulierte global-agierende Salzsensoren in *B. subtilis* ist (278, 279). Unter der zu Hilfenahme eines sogenannten Chimärenzyms sollte analysiert werden, ob das *yqiHIK* noch salzinduzierbar ist. Dieses Chimärenzym besitzt die Transmembrandomänen sowie die Sensordomäne (PAS und PAC) der Histidinkinase KinC und die Dimerisierungsdomäne sowie die katalytische Domäne von DegS (193). KinC reguliert die Expression von Genen, dessen Genprodukte an der Biofilmbildung und Sporulation beteiligt sind, indem es Spo0F und Spo0A phosphoryliert (76). Durch die Transmembrandomänen liegt KinC genauso wie KinB und KinD in der Membran verankert vor. KinA ist die einzige Kinase aus dem Phosphorelay von Spo0A, welche im Zytoplasma lokalisiert. Dieses Chimärenzym wurde in einer früheren Publikation von Lopez *et al.* konstruiert und es konnte gezeigt werden, dass das Enzym ein extrazelluläres Signal, nämlich das Ausströmen von Kaliumionen, wahrnimmt (193). Das Ausströmen von Kaliumionen kann durch die Zugabe des kleinen Moleküls Nystatin verursacht werden, welches sich in zelluläre Membranen einlagern kann, dort Poren formt und so eine Efflux von Ionen verursacht (30). Das Chimärenzym ist also in der Lage ein extrazelluläres Signal wahrzunehmen und durch seine katalytische Domäne den Antwortregulator DegU durch Phosphorylierung zu aktivieren. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Wildtyp DegS Kinase nicht auf Nystatin reagiert (193). Eine andere Studie zeigte, dass

nur KinD, eine weitere membrangebundene Kinase auf Salzstress reagiert, da die Phosphataseaktivität von KinD durch osmotischen Stress reprimiert wird. Dies hat zur Folge, dass Spo0A nicht mehr dephosphoryliert wird und dadurch die intrazelluläre Konzentration von Spo0A~P ansteigt. Erhöhte Konzentrationen von Spo0A~P reprimieren die Gene für die Matrixproduktion (272). Dahingegen wurde die Aktivität der Kinasen KinA, KinB und KinC nicht durch osmotischen Stress beeinflusst (272). Wäre DegS der intrazelluläre Salzsensordomäne dürfte der *yqiHIK* Promotor durch das Chimärenzym keine Salzinduktion aufweisen. Der Grund ist, dass keine Kinase im Zytoplasma vorhanden ist, die das Signal des Salzstress wahrnimmt und weiterleitet. Die Sensordomäne von KinC reagiert wie bereits erwähnt nicht auf ein osmotisches Signal. Auf Grund dessen wurde das Chimärenzym KinC-DegS genutzt und mit dem *yqiH-treA* Reportergerkonstrukt kombiniert (SLB130).

Der Wildtyp Fusionsstamm KFB41 sowie die Stämme KFB72 ($\Delta degSU$) und SLB130 wurden in SMM sowie SMM + 1,2 M NaCl kultiviert, bei Eintritt in die exponentielle Phase ($OD_{578} 1,5 \pm 0,2$) wurden Proben geerntet und in den TreA-Enzymassay eingesetzt. Unter normalen physiologischen Bedingungen zeigte sich kein Unterschied zwischen den drei Stämmen, alle exprimierten das *yqiHIK* Operon auf einem basalen Transkriptionsniveau (Abb. 36). Unter hyperosmotischen Bedingungen wurde *yqiHIK* in dem Chimärenzym-Hintergrund (SLB130) noch auf circa 20 Units exprimiert. Diese Promotoraktivität entsprach nur einem Drittel der normalen Promotoraktivität von *yqiHIK* unter hyperosmotischen Bedingungen im Wildtyp. *yqiHIK* ist aber immer noch salzinduzierbar, jedoch nicht auf dem Niveau des Wildtyps. In der Deletionsmutante des DegS-DegU TCS (KFB72) ist unter beiden Bedingungen nur eine basale Aktivität messbar.

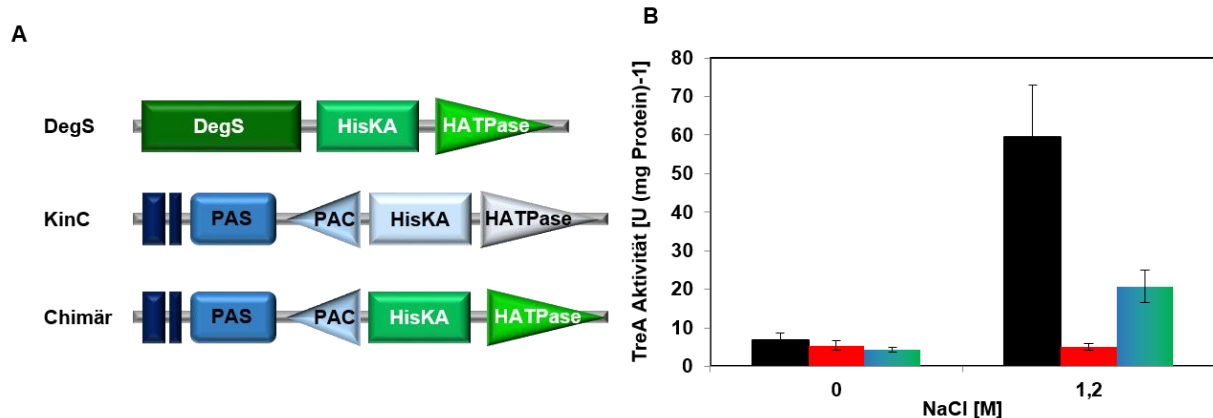


Abb. 36: Die Auswirkung eines KinC-DegS Chimärenzyms auf die Promotoraktivität von *yqiHIK*

(A) Schematische Darstellung der Konstruktion des KinC-DegS Chimärenzyms. In grün sind die Domänen der DegS Kinase dargestellt. In Blau die Domänen der KinC Kinase. Die Transmembrandomänen sind als dunkelblaue Rechtecke gekennzeichnet. HisKA ist die Phosphorylierungsdomäne. HATPase ist die ATPase Domäne. PAS und PAC sind die Sensordomänen von KinC. (B) Gezeigt ist die TreA-Aktivität der *yqiH-treA* Fusionsstämme KFB41 (Wildtyp schwarz), KFB72 [$\Delta degSU$, rot] und SLB130 [*kinC-degS(Hyb)*, blaugrün], die in SMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl inkubiert wurden. Proben für den TreA Enzymtest wurden in der exponentiellen Phase gezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

Dieses Experiment zeigt, dass das *yqiHIK* Operon trotz der membrangebunden Kinase, die die Sensordomäne von KinC trägt immer noch osmotisch induzierbar ist. Die Zelle kann also immer noch das Salzstresssignal wahrnehmen und eine Antwort hervorrufen. Es zeigt aber auch, dass das DegS-DegU

TCS wichtig für die Expression von *yqiHIK* ist, da die Promotoraktivität in diesem Chimärenzystemstamm geringer im Vergleich zum Wildtypstamm ist.

3.7 Die Deletion von RapG-PhrG zeigt keinen Einfluss auf die Expression von *yqiHIK*

In dieser Studie konnte bisher gezeigt werden, dass das DegS-DegU TCS einen maßgeblichen Einfluss auf die Expression von *yqiHIK* hat. Dies konnte auch für die extrazelluläre alkaline Protease AprE gezeigt werden (236). In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss des RapG-PhrG Systems auf das DegS-DegU TCS nachgewiesen, indem *aprE* als Kontrollgen genutzt wurde. Die zytoplasmatische Sensorkinase nimmt ein intrazelluläres Signal wahr, welches zur Autophosphorylierung von DegS führt. Es folgt eine Transphosphorylierung von der Sensorkinase auf den Antwortregulator DegU. Zunächst kann der Transkriptionsfaktor aber nicht an den DNA Bereich vor dem Zielgen binden, da er durch RapG inhibiert wird. RapG ist eines von 11 Rap Proteinen in *B. subtilis*, besitzt aber im Gegensatz zu anderen charakterisierten Rap Proteinen keine Phosphataseaktivität. Vielmehr wird die DegU Aktivität durch direkte Bindung des RapG Proteins an DegU inhibiert. *rapG* wird in einem Operon mit *phrG* simultan transkribiert und die Expression beider Gene wird durch hypertones Medium induziert (236, 299). *phrG* wird als Prä-Propeptid synthetisiert und über den Sec-abhängigen Translokationsmechanismus ins extrazelluläre Milieu transportiert. Außerhalb der Zelle wird das Propeptid prozessiert, sodass das reife Pentapeptid entsteht. Dieses wird über den Oligopeptidtransporter Opp wieder in das Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma kann PhrG an RapG binden und so den RapG-DegU Komplex aufheben (Abb. 6). Dadurch kann das phosphorylierte DegU Protein an die Promotorregion von *yqiHIK* binden und dessen Expression aktivieren (86). Dieses Regulationsmodell konnte bereits für *aprE* gezeigt werden (236). Eine Deletion von *rapG* führt zu einer Erhöhung der *aprE* Expression um circa 25 %. Im Gegensatz dazu wird die *aprE* Promotoraktivität durch eine Deletion von *phrG* um 35 % reduziert.

In diesem Abschnitt sollte nun auch der Einfluss des RapG-PhrG Systems auf die DegS-DegU abhängige Regulation von *yqiHIK* unter hyperosmotischen Bedingungen demonstriert werden. Hierfür wurde eine Deletion des gesamten *rapG-phrG* Operons (SLB4) konstruiert sowie eine Deletion von *phrG* (SLB5). In diese Stämme wurde das Wildtyp *yqiH-treA* Reportergenkonstrukt eingebracht. Die Fusionsstämme KFB41 (Wildtyp), SLB6 ($\Delta rapG-phrG$) und SLB8 ($\Delta phrG$) wurden in SMM sowie SMM + 1,2 M NaCl kultiviert, bei Eintritt in die exponentielle Phase geerntet und in den TreA-Aktivitätstest eingesetzt. Das Expressionsmuster aller drei Stämme war unter isoosmotischen als auch unter hyperosmotischen Bedingungen identisch (Abb. 37). Unter den getesteten Bedingungen konnte kein Einfluss des RapG-PhrG Systems auf die *yqiHIK* Expression festgestellt werden.

Weiterhin wurde die Expression des *yqiHIK* Promotors in SMM mit ansteigenden Salinitäten bestimmt, um die Frage zu beantworten, ob die Deletion von *rapG-phrG* dazu führt, dass DegU~P ungehindert an die Promotoregion von *yqiHIK* binden kann und das Operon nun durch geringere Konzentrationen an NaCl induzierbar ist. Hierfür wurden die Stämme KFB41 (Wildtyp) und SLB6 ($\Delta rapG-phrG$) in SMM mit steigender Salzkonzentration (0 M - 1,2 M NaCl in 100 mM Schritten) kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet. Der TreA-Aktivitätsassay konnte jedoch keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp (KFB41) und einer Deletion des RapG-PhrG Systems (SLB6) aufweisen (Abb. 37 B).

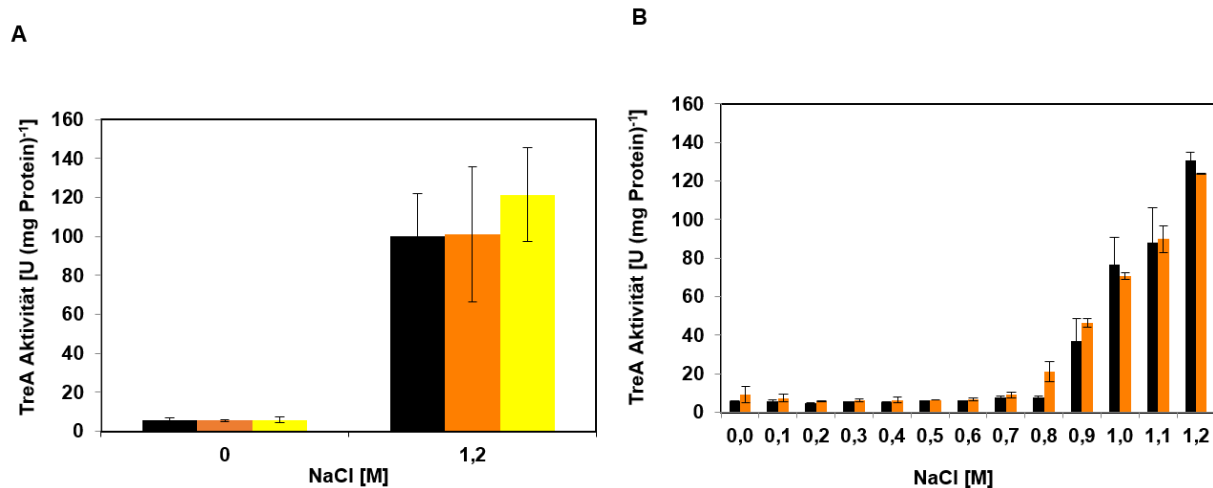


Abb. 37: Der Einfluss des RapG-PhrG Systems auf die Expression von *yqiHIK*

(A) Gezeigt ist die TreA-Aktivität der *yqiH-treA* Fusion im Wildtyp (KFB41, schwarz), in der $\Delta rapG-phrG$ Mutante SLB6 (orange) und der $\Delta phrG$ Mutante (gelb). Die Bestimmung der TreA-Aktivität erfolgte in SMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl. (B) Abgebildet ist die TreA-Aktivität der *yqiH-treA* Fusionsstämme KFB41 (WT schwarz) und SLB [$\Delta rapG-phrG$, orange], die in SMM mit ansteigenden Salzkonzentrationen (0 M NaCl bis 1,2 M NaCl) inkubiert wurden. Proben für den TreA-Enzymtest wurden in der exponentiellen Phase gezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

3.8 Lokalisation der Proteine YqiH, YqiI und YqiK

Eine wichtige Frage die sich bei der facettenreichen Regulation von *yqiHIK* stellt, ist die nach der physiologischen Rolle der Proteine YqiH, YqiI und YqiK. Die Amidasefunktion des gereinigten YqiI Proteins konnte bereits durch ein Zymogramm bestätigt werden (87), jedoch blieb offen wo YqiI seiner Funktion nach kommt. Eine exakte funktionelle Analyse der Autolysine ist schwierig, da diese Enzymklasse eine hohe Redundanz aufweist (294). Jedoch kann man sich über die Lokalisation der Autolysine an die Funktion herantasten. Auf Grund eines Signalpeptids in der YqiI Aminosäuresequenz wird vermutet, dass YqiI in das äußere Milieu sekretiert wird. Andererseits besitzt das reife YqiI Protein keine Zellwandbindedomäne, die charakteristisch für Autolysine ist (294, 322). Trotz dieser Eigenschaften konnte YqiI nicht im Sekretom von *B. subtilis* identifiziert werden (7-9, 131, 310).

Um zu analysieren wo die Proteine, die durch *yqiHIK* synthetisiert werden, lokalisieren wurden diese mit einer spezifischen Markierung (FLAG-Tag) versehen und anschließend in einer Antikörper-vermittelten Detektion, dem Western Blot, analysiert. Als Kontrolle, für ein extrazytoplasmatisch lokalisiertes Protein, wurde noch eine *aprE*-FLAG-Tag Fusion konstruiert. Alle Fusionskonstrukte unterlagen ihrem natürlichen Promotor, sodass in hypertonem Medium eine erhöhte Expression stattfand. Zusätzlich wurden sie in den DegU-Hypermuranten Stammhintergrund eingebracht um die Expression der Gene weiter zu erhöhen. Die daraus resultierenden Stämme wurden in 100ml SMM + 1,2 M NaCl kultiviert. Die Proben wurden wie in Abschnitt 5.8 im Material und Methodenteil vorbereitet und im Western Blot analysiert. Abb. 38 A zeigt das Ergebnis des Western Blots mit den Proben aus dem Zellextrakt und Abb. 38 B zeigt den Überstand der jeweiligen Kulturen.

Für YqiH konnte keine Lokalisation bestimmt werden, dies könnte an der Zytoplasmamembranbindenden Eigenschaft von dem Lipoprotein YqiH liegen. Ein weiterer spezifischer Fraktionierungsschritt für Membranproteine müsste durchgeführt werden um dieses Protein zu lokalisieren.

Wie eindeutig zu erkennen ist, lokalisierte die Phosphodiesterase YqiK im Zytoplasma und war nicht im Überstand detektierbar. Weder Yqil noch AprE konnten im Zytoplasma detektiert werden. Dahingegen konnten beide Proteine im Überstand detektiert werden.

Durch den Western Blot wurde YqiK eindeutig im Zytoplasma lokalisiert und Yqil konnte im Überstand lokalisiert werden. Dieses Ergebnis suggeriert, dass Yqil in der Tat sekretiert wird und eine Funktion im extrazellulären Milieu innehat.

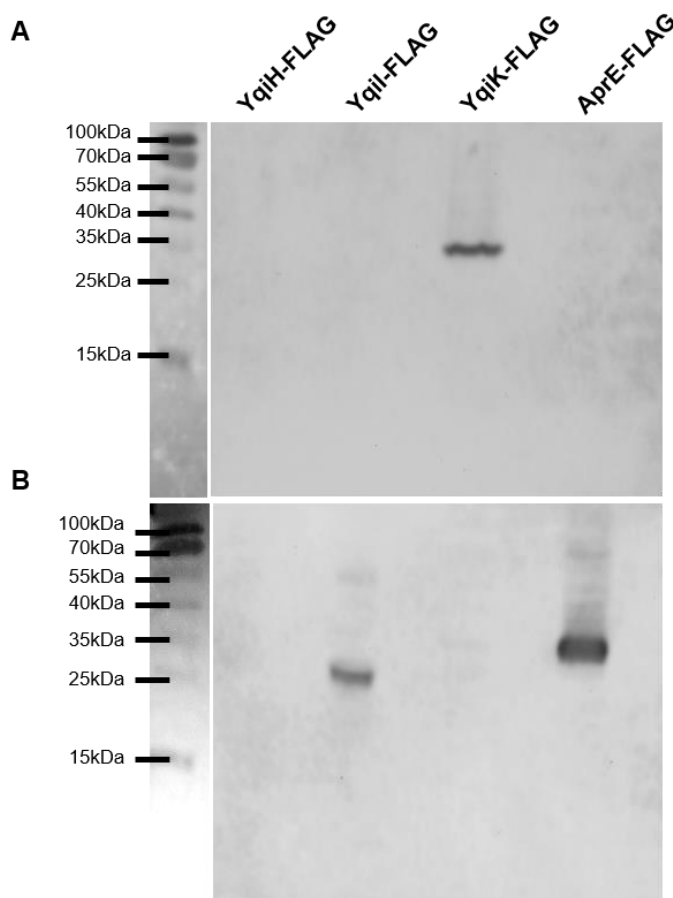


Abb. 38: Western Blot Analyse der Proteine YqiH, Yqil, YqiK und AprE

(A) Zellextrakt Proben und (B) Überstand Proben. Die Stämme SLB110 (*yqiH*-FLAG), SLB112 (*yqil*-FLAG), SLB114 (*yqiK*-FLAG) und SLB116 (*aprE*-FLAG) wurden in SMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet. Der Überstand wurde mittels Trichloressigsäure ankonzentriert und das Zellpellet mit Lysozym und SDS aufgeschlossen. Alle Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versehen und auf das SDS-Gel geladen. Die Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und im Western Blot detektiert. Für YqiH-FLAG und YqiK-FLAG wurden molekulare Massen von 14 kDa und 31 kDa bioinformatisch bestimmt. Für die Yqil-FLAG und AprE-FLAG wurden mittels bioinformatischer Analysen molekulare Massen von 26 kDa und 43 kDa ermittelt.

V Diskussion und Ausblick

Bacillus subtilis ist ein im Boden lebender Mikroorganismus, der in seinem Habitat verschiedensten abiotischen Stressen ausgesetzt ist. Die Verfügbarkeit von Wasser spielt eine große Rolle, da Wasser einen der wichtigsten Parameter für das Wachstum und die Vermehrung von Mikroorganismen darstellt. Bakterien können Wasser nicht aktiv über die Zellmembran aus der Zelle heraus oder in die Zelle hinein transportieren. Wasser strömt passiv durch die bakterielle Zytoplasmamembran entlang des osmotischen Gradienten, der zwischen dem Zytoplasma und der Umgebung besteht. Dadurch wirken sich Veränderungen in der Osmolarität der Umgebung direkt auf den Wassergehalt des Zytoplasmas und damit auf den Zellturgor aus. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass ein osmotischer „Up-Shock“ (plötzliche Erhöhung der externen Osmolarität) einer der stärksten Induktoren der generellen Stressantwort in *B. subtilis* ist. Diese wird über den alternativen Transkriptionsfaktor SigB vermittelt (119, 228). Ein osmotischer Up-Shock führt bei einer *sigB* Deletionsmutante zu einem salzsensitiven Phänotyp. In Zusammenhang damit wird die SigB-abhängige Kaskade in *B. subtilis* unmittelbar nach einem hyperosmotischen Up-Schock induziert, was dann aber lediglich eine transiente Genexpression der Zielgene mit sich zieht. Inaktiviert man SigB-abhängige Gene führt dies ebenfalls zu einem salzsensitiven Phänotyp unter starken, hyperosmotischen Stressbedingungen (1,5 M NaCl). SigB ist also unter Salzschockbedingungen wichtig für *B. subtilis*, jedoch wird dieser Transkriptionsfaktor nicht für Zellen benötigt, die einem kontinuierlichen Salzstress ausgesetzt sind (140, 141). Der zentrale Mechanismus zur Anpassung an hyperosmotischen Stress verläuft in *B. subtilis* über die Akkumulation von kompatiblen Soluten, wie zum Beispiel Prolin und Glycin-Betain (38, 39, 43). Diese wirken dem Wassereinstrom unter hyperosmotischen Bedingungen entgegen und führen zur Stabilisierung des Zellturgors. Aus einer früheren Transkriptomstudie salzgestresster *B. subtilis* Zellen geht hervor, dass die am stärksten induzierten Gene *proH* und *proJ* sind (299). Die Genprodukte sind beide essentiell für die Prolinbiosynthese, die einen wichtigen Adaptationsmechanismus an hyperosmotische Bedingungen darstellt. Direkt nach *proHJ* werden die Gene *yqiH* und *yqiI* am stärksten durch Salzstress induziert. Beide Gene werden in einem Operon mit *yqiK* kodiert (87). In einer vorherigen Promotion konnte gezeigt werden, dass das *yqiHIK* Operon durch das DegS-DegU Zwei-Komponenten System (TCS) positiv reguliert wird (86). Interessanterweise konnte außerdem ein großer Überlapp zwischen dem DegU-Regulon und dem Transkriptom salzgestresster Zellen festgestellt werden (197, 299). Dadurch wird vermutet, dass das TCS eine Rolle bei der Salzstressadaptation spielt (299). Im Verlauf dieser Dissertation wurde die Rolle des DegS-DegU TCS während der Osmoadaptation untersucht. Auf Grund der starken Salzinduktion und der Regulation durch DegS-DegU befasste sich die zentrale Untersuchung dieser Dissertation mit der Analyse der Regulation des osmotisch induzierbaren *yqiHIK* Operons, sowie dessen Regulation durch das DegS-DegU Zwei-Komponenten System.

1 Analyse des DegS-DegU TCS

Das DegS-DegU TCS wurde in der Vergangenheit oft als das System erwähnt, welches den Salzstress wahrnimmt (279). Dem liegt zu Grunde, dass Gene, die durch den Antwortregulator DegU reguliert werden, auch durch Salzstress reguliert werden. DegU~P ist für die Aktivierung zahlreicher Exoproteasen

zuständig, wie zum Beispiel der Levansucrase SacB oder der alkalinen Exoprotease AprE. Dabei konnte gezeigt werden, dass *sacB* durch Salz induziert wird und *aprE* durch hyperosmotische Bedingungen reprimiert wird (180). Aber auch die Expression von *degQ*, dessen Genprodukt die Transphosphorylierung von DegS auf DegU stabilisiert, wird durch Salzstress induziert (279). Ein weiterer Hinweis, war die Salzinduktion des DegS-DegU TCS. In der Zelle ist immer eine basale Transkriptmenge an DegS und DegU ($\pm \sim P$) vorhanden, da der Promotor vor *degS* konstitutiv auf einem niedrigen Transkriptionsniveau exprimiert wird (221). Doch sobald die Bedingungen in Richtung hoher Salinität schiften wird die Expression von *degSU* gesteigert (299). Für *degU* konnte ferner gezeigt werden, dass in der stationären Phase ein positiver Feedback Loop entsteht, da der Promotor (*degU_{P3}*) vor *degU* in dieser Phase angeschaltet und zusätzlich durch DegU~P positiv reguliert wird (341). DegS ist, neben YhcY, die einzige zytoplasmatisch lokalisierte Sensorkinase eines Zwei-Komponenten Systems. Dies impliziert, dass diese Sensorkinase einen Stimulus im Zellinneren wahrnimmt. Durch hyperosmotische Bedingungen verändert sich zum Beispiel die intrazelluläre Ionen- und Solutzusammensetzung, wie zum Beispiel die der Kaliumionen. Diese Veränderungen könnten von einem intrazellulären Sensor wahrgenommen werden. Auf Grund dieser Eigenschaften des DegS-DegU TCS wurde angenommen, dass das TCS in die Salzstressadaptation involviert ist und DegS der Salzsensoren in *B. subtilis* ist (278, 279).

Um die Rolle des DegS-DegU TCS während der Osmoadaptation zu analysieren wurde zunächst die osmotische Regulation des DegS-DegU TCS analysiert, sowie dessen physiologische Rolle unter hyperosmotischen Bedingungen.

1.1 Osmotische Induktion des DegS-DegU TCS

Durch die Kultivierung der Reporterfusionenstämme der *degS* und *degU* Promotoren (Abb. 11 A) in hypertonem Medium konnten gezeigt werden, dass beide Promotoren auf Salzstress reagieren und die Expression dadurch erhöht wird (Abb. 11 B und Abb. 12). Die Promotoraktivität von *degS_{P1}* und *degU_{P3}* wird nicht nur durch die ionische Substanz NaCl induziert, sondern auch durch andere nicht ionische Substanzen wie Saccharose und Laktose (Tabelle 1). Das DegS-DegU TCS reagiert also nicht nur auf Salzstress, sondern im Allgemeinen auf osmotischen Stress. Durch die Analyse beider Promotoren in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass *B. subtilis* in der Lage ist kleine Veränderungen der externen Osmolarität wahrzunehmen und die zellulären Prozesse in Abhängigkeit dieser Veränderung anzupassen. Dadurch wird gewährleistet, dass bei einer niedrigen Osmolarität Gene nicht höher exprimiert werden als eigentlich nötig. Dies konnte schon für andere osmotisch induzierbare Promotoren (*proH* und *opuA*) gezeigt werden, die auch einen proportionalen Anstieg ihrer Promotoraktivität in Abhängigkeit der externen Salzkonzentration aufweisen, jedoch nicht von dem DegS-DegU TCS abhängig sind (41, 134). Interessanterweise erreicht der *degU_{P3}* Promotor ab einer NaCl-Konzentration von 0,8 M ein Limit von circa 600 Units, wenn er in der DegS-Hypermutable analysiert wird (Abb. 14). Dies könnte entweder daran liegen, dass hier das eigentliche Limit des *degU_{P3}* Promotors liegt oder dass die Menge an DegU~P in der DegS-Hypermutable nicht mehr ansteigen kann, da zu wenig Sensorkinase vorhanden ist um DegU zu phosphorylieren. Letztendlich führten erhöhte Mengen an DegU~P nicht nur zu einer Veränderung des Expressionsmusters, sondern auch zu einer

allgemeinen Erhöhung der Promotoraktivität. Dieses Phänomen wird durch den positiven Feedback Loop von DegU~P auf seinen eigenen Promotor erklärt. Dieser positive Feedback Loop wurde bisher für *degU_{P3}* bei dem Übergang von der exponentiellen Phase zur stationären Phase nachgewiesen (341). Erstmals konnte also der positive Einfluss von DegU~P auf seinen eigenen Promotor auch unter Salzstressbedingungen nachgewiesen werden. Um DegU zu phosphorylieren bedarf es zunächst der Phosphorylierung von DegS, welches dann sein Phosphat auf DegU transferiert. Der positive Feedback Loop von DegU~P auf seinen eigenen Promotor wird unter hyperosmotischen Bedingungen verstärkt, sodass man davon ausgeht, dass DegS in Antwort auf ein osmotisches Signal phosphoryliert wird um dann DegU zu phosphorylieren. Würde DegS nicht auf ein osmotisches Signal hin phosphoryliert werden, könnte der positive Feedback Loop unter hyperosmotischen Bedingungen nicht noch verstärkt werden.

Man könnte nun spekulieren, dass ein osmotisch induzierbares TCS eine essentielle Rolle bei der Osmostressadaptation spielt. Entgegen dieser Hypothese ist zum Beispiel das TCS EnvZ-OmpR aus *Shewanella oneidensis* osmotisch induzierbar, eine Deletion dieses Systems weist aber keinen Wachstumsdefekt auf (345). In *Yersinia enterocolitica* konnte hingegen gezeigt werden, dass die Deletion des Antwortregulators OmpR zu einem sehr sensitiven Phänotyp in Bezug auf einen osmotischen Schock führt (46). In *Aspergillus fumigatus* ist die Sensorkinase TcsC eines Zwei-Komponenten System nötig für das Wachstum unter hyperosmotischem Stress, aber entbehrlich unter physiologischen Wachstumsbedingungen (209). Dadurch stellte sich die Frage, ob das DegS-DegU TCS in *B. subtilis* einen Einfluss auf dessen Wachstumsverhalten unter Salzstressbedingungen hat.

1.2 Der Einfluss des DegS-DegU TCS auf das Wachstum von *B. subtilis*

Die Kultivierung von einer *degSU* Deletionsmutante unter isoosmotischen Bedingungen führte zu keiner Veränderung des Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp 168. Unter hyperosmotischen Bedingungen konnte aber eine Verlängerung der Lag-Phase beobachtet werden (Abb. 16). Dies zeigt zwar, dass das DegS-DegU TCS in die Adaptation an Salzstress involviert ist, jedoch schließt dies DegS als zentralen Osmosensor aus, da *B. subtilis* sich, wenn auch verzögert, immer noch an den osmotischen Stress anpassen kann. Im Vergleich zu der leicht verlängerten Lag-Phase der *degSU* Deletionsmutante führt die Deletion von *proHJ* zu einem stark salzsensitiven Phänotyp (41). Dieses Operon kodiert für Proteine der Prolinsynthese und ist dadurch essentiell wichtig um *B. subtilis* an erhöhte Osmolaritäten anzupassen. Dies zeigt auch, dass DegS nicht essentiell wichtig ist, um die Zelle an Salzstress anzupassen, da das Operon *proHJ* nicht von dem DegS-DegU TCS abhängt (Abb. 53). Ein weiterer Indikator ist die Salzinduktion der Gene die für den OpuA Transporter kodieren. Dieser Transporter ist nötig um extern zugegebenes Glycin-Betain oder andere kompatible Solute aufzunehmen und ist somit auch wichtig für die Adaptation an osmotischen Stress. Auch dieser Promotor ist unabhängig von dem DegS-DegU TCS [Abb. 53 und (134)].

In *E. coli* gibt es ein TCS, welches aus der Histidinkinase EnvZ und dem Antwortregulator OmpR besteht. EnvZ ist eine membrangebundene Histidinkinase, welche Veränderung in der Osmolarität wahrnimmt. Jedoch ist das exakte Signal für die Aktivierung des TCS nicht bekannt. Die letzte Hypothese besagte, dass EnvZ ein intrazelluläres Signal wahrnimmt (82, 263). Hohe Osmolaritäten verändern die Konformation des zytoplasmatischen Teils der Kinase EnvZ, sodass angenommen wird, dass ein

zytoplasmatisches Signal von der Sensorkinase wahrgenommen wird (326). EnvZ wurde in *E. coli* als Osmosensor identifiziert (264). Durch die Deletion des TCS EnvZ-OmpR in *E. coli* konnte kein Phänotyp in Hinblick auf die Salzsensitivität festgestellt werden. Das TCS EnvZ-OmpR aktiviert die Gene *ompC* und *ompF*, dessen Genprodukte OmpC und OmpF Porine in der äußeren Membran von *E. coli* bilden, durch die kleine hydrophile Moleküle nach innen diffundieren können (231). Beide Porine sind wichtig für das Wachstum von *E. coli* unter hyperosmotischen Bedingungen bei einem alkalischen pH (155).

Auf Grund der verlängerten Lag-Phase in einer $\Delta degSU$ Mutante stellte sich die Frage, welche Prozesse das TCS beeinflusst um diesen Wachstumsphänotyp hervorzurufen. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird der osmotische Stress über den HOG Weg (high osmolarity glycerol) und spezifische Osmosensoren (Sho1p und Sln1p) erkannt. Die Erkennung des osmotischen Stresses führt zur Synthese von Glycerin, welches als kompatibles Solut Schutz bietet (135, 213, 232). Derselbe Mechanismus findet in *B. subtilis* statt, es wird aber das kompatible Solut Prolin in Antwort auf osmotischen Stress akkumuliert (41). Ein Grund für die verlängerte Lag-Phase des $\Delta degSU$ Deletionsstamms könnte in der akkumulierten Menge an Prolin liegen. Prolin ist das Einzige *de novo* synthetisierte kompatible Solut in *B. subtilis*. Dieses kann über einen anabolen Syntheseweg synthetisiert werden, aber auch über einen osmoadaptiven Biosyntheseweg. Dabei entsteht Prolin ausgehend von Glutamat über drei enzymatische Schritte. In dem osmoadaptiven Syntheseweg von Prolin spielen die γ -Glutamat-Kinase ProJ, die γ -Glutamylphosphat-Reduktase ProA und die Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase ProH eine entscheidende Rolle. Das *proHJ* Operon ist osmotisch induzierbar und die Höhe der Transkription steigt proportional mit der Höhe des externen osmotischen Stresses an (41). Reporteranalysen des *proHJ* Operons zeigten, dass die *proHJ* Promotoraktivität auf Transkriptionsebene nicht von dem DegS-DegU TCS abhängt und unter hochosmolaren Bedingungen wird in der $\Delta degSU$ Mutante nur geringfügig weniger Prolin angereichert (Abb. 19). Ein Grund für die leicht verlängerte Lag-Phase der Deletionsmutante konnte bisher nicht identifiziert werden. Die Tatsache, dass Prolin nicht an der verzögerten Lag-Phase beteiligt ist, schließt aber nicht die Involvierung andere kompatibler Solute aus. Vor kurzem wurde Arginin als kompatibles Solute in der Hefe *Candida glabrata* identifiziert (338). In *B. subtilis* haben Aminosäuren, die über den Zellstoffwechsel in Prolin umgewandelt werden können (so auch Arginin), osmoprotektive Eigenschaften, wenn sie extern zu gefüttert werden (347). Allerdings konnte bisher nur die Aminosäure Prolin als *de novo* synthetisiertes Osmoprotektivum identifiziert werden (176, 331). Um zu testen, ob die Deletionsmutante des DegS-DegU TCS im Vergleich zum Wildtyp andere Solute weniger stark akkumulieren kann, könnte eine ^{13}C NMR oder eine HPLC-Analyse durchgeführt werden.

1.2.1 Der Einfluss von DegU~P auf das Wachstumsverhalten von *B. subtilis*

Für das DegS-DegU TCS konnten sogenannte Hypermuranten [*degS200*(Hy) und *degU32*(Hy)] identifiziert werden, die zu einem veränderten Phänotyp in Hinblick auf die Exoproteaseaktivität, die Flagellenbildung und genetische Kompetenz führen (167, 178, 317). Durch die Deletion des DegS-DegU TCS verändert sich das Wachstumsverhalten von *B. subtilis* unter hyperosmotischen Bedingungen. Dies lässt vermuten, dass auch die Hypermuranten einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *B. subtilis* haben. Betrachtet man nun das Wachstumsverhalten der beiden Hypermuranten, ist eine deutliche Wachstumssteigerung gegenüber dem *B. subtilis* Wildtyp sowohl unter normal physiologischen als auch

unter hyperosmotischen Bedingungen festzustellen. Dies zeigt, dass die erhöhten Konzentrationen an DegU~P zu einer erhöhten Transkription von Zielgenen führt, die das Wachstum von *B. subtilis* positiv beeinflussen. Die erste Idee für eine Erklärung, ist die Akkumulation von kompatiblen Soluten, in diesem Fall von dem *de novo* synthetisierten Solut Prolin. In Bezug auf die Prolinmenge konnte nur für die DegU-Hypermutante eine leicht erhöhte Menge an Prolin ermittelt werden, die auch nicht mit einer verstärkten *proHJ* Promotoraktivität einhergeht (Abb. 19). Unter physiologischen Bedingungen, unter denen das Wachstum der Hypermutanten gegenüber dem Wildtyp ebenfalls gesteigert ist, wird im Wildtyp sowie in den Mutanten gleich viel Prolin akkumuliert. Um zu testen, ob die Hypermutanten im Vergleich zum Wildtyp andere Solute akkumulieren, die zur Wachstumssteigerung führen, könnte eine ^{13}C NMR oder eine HPLC-Analyse durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass erhöhte Konzentrationen an DegU~P einen Einfluss auf den Kohlenstoffwechsel von *B. subtilis* haben könnten. Die Katabolitrepression erlaubt es Mikroorganismen sich schnell an eine bevorzugte Kohlenstoffquelle anzupassen und diese als Energiequelle zu nutzen. Dies wird durch die Inhibition der Synthese verschiedener Enzyme bewerkstelligt. Die inhibierten Enzyme sind in dem Katabolismus anderer Kohlenstoffquellen, als der bevorzugten Kohlenstoffquelle, involviert. Die Katabolitrepression wurde ausführlich in *E. coli* studiert, wobei gezeigt wurde, dass Glukose die bevorzugte Kohlenstoffquelle ist und andere Verwertungswege wie zum Beispiel die von Laktose erst sekundär angeschaltet werden. In *B. subtilis* wird die Katabolitrepression über das Katabolit Kontrollprotein A (CcpA) reguliert. CcpA ist ein Repressor, der die Operons für andere Metabolitverwertung abschaltet, wenn Glukose vorhanden ist. HprK (eine essentielle Kinase der CCR) wird phosphoryliert, sobald Glukose über das Membranprotein EIIC aufgenommen wird. HprK führt dann zur Aktivierung von CcpA, welches die Transkription von alternativen Katabolitwegen blockiert [Zusammengefasst in (102)]. CcpA reguliert in *B. subtilis* Prozesse wie die Glykolyse, die Glukoneogenese, den TCA Zyklus (engl. *tricarboxylic acid cycle*, Tricarbonsäure-Zyklus) und den Stickstoffmetabolismus. In *B. subtilis* gibt es fünf wichtige Schlüsselemente für die CCR: Den Transkriptionsfaktor CcpA, das HPr Protein des Phosphotransferasesystems, die bifunktionelle HPr Kinase/Phosphorylase (HPrK) und zwei Intermediate aus der Glykolyse (Fructose-1,6-Bisphosphat und Glukose-6-Phosphat). Für die Signalweiterleitung der CCR ist die Phosphorylierung des Transporterproteins HPr essentiell. HPr~P dient als Effektor für CcpA und fördert seine Bindung an Operatoren und die schlussfolgernde Transkriptionsregulation. Die Phosphorylierung des Transporterproteins HPr erfolgt mittels der Kinase HprK. Die Interaktion von CcpA und HPr~P wird durch erhöhte Fructose-1,6-Bisphosphat und Glukose-6-Phosphat Mengen verstärkt. Der CcpA-HPr~P Komplex bindet an spezifische, sogenannte *cre* Sequenzen in der Promotorregion des Zielgens. Je nachdem wo die *cre* Sequenz lokalisiert ist, kann CcpA als Aktivator oder Repressor agieren. In *B. subtilis* wurde DegU~P als Repressor für die CCR identifiziert (308). Ein Anhaltspunkt dafür war die Produktion eines neuen Transkripts von *rocG*, welches normalerweise durch die CcpA-abhängige CCR reprimiert wird. In der DegU-Hypermutante wurde außerdem die Expression von *lctE* erhöht. *lctE* kodiert für die Lactatdehydrogenase, welche die Lactatsynthese in *B. subtilis* unter anaeroben Bedingungen fördert. Unter den in dieser vorangegangenen Studie getesteten Bedingungen wäre also eine Erhöhung der Laktatproduktion zur Energiegewinnung nicht nötig (308). Es wird davon ausgegangen, dass die Erhöhung der Lactatsynthese dazu führt, dass Glykolyseintermediate verbraucht werden. Darunter fällt

auch Fructose-1,6-Bisphosphat, welches in der Tat in reduzierten Mengen in der DegU-Hypermutable vorliegt (308). Durch die geringeren Mengen an Fructose-1,6-Bisphosphat wird vermutlich HPrK inaktiviert, was wiederum zu einer Reduktion des CcpA-HPr~P Komplexes und der Blockierung der CCR führt (308). In *Staphylococcus xylosus* reichen 0,5 % Glukose aus um die CCR zu aktivieren (144, 247). Diese Glukosekonzentration ist in SMM gegeben, sodass die CCR im Wildtyp aktiv sein sollte und Glukose bevorzugt verstoffwechselt werden sollte. Dagegen würde die Blockade der CCR in den Hypermutablen dazu führen, dass alternative Gene exprimiert werden, wie das *rocG* Gen, welches für eine Glutamatdehydrogenase kodiert. RocG ist Teil des Argininabbauweges und wandelt L-Glutamat in α -Ketoglutarat um. In *B. subtilis* hat es nur katabolische Aktivitäten (65). α -Ketoglutarat kann in den TCA Zyklus einfließen, zum Zweck der Energiegewinnung und der Bereitstellung von Zwischenprodukten für Biosynthesen. Normalerweise werden Proteine des TCA Zyklus durch CcpA über die Katabolitrepression inhibiert (311). Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass *rocG* nicht das einzige Gen ist, dessen Expression durch die DegU-Hypermutable von der Katabolitrepression befreit wird. Somit können noch andere Nahrungsquellen bereitgestellt werden, die ein verbessertes Wachstum für *B. subtilis* ermöglichen. Um zu testen ob die Glykolyse in der DegU-Hypermutable im Vergleich zum Wildtyp verändert abläuft, könnten die Glykolyseintermediate bestimmt werden. Dabei können mittels Ionenchromatographie-Massenspektrometrie und Gaschromatographie-Massenspektrometrie die Glykolyseintermediate nachgewiesen werden (314).

Im Hinblick auf das Wachstumsverhalten der Hypermutablen ist zu beachten, dass die in den Hypermutablen [*degU32*(Hy) und *degS200*(Hy)] vorliegende künstlich erhöhte DegU~P Konzentration voraussichtlich nicht die DegU~P Menge im natürlichen System widerspiegelt. Es besteht also die Möglichkeit, dass nicht künstlich, sondern physiologisch erhöhte Konzentrationen an DegU~P keinen starken Einfluss auf das Wachstum von *B. subtilis* haben. Ein Beispiel ist das EnvZ-OmpR System aus *E. coli*. In *E. coli* wurde eine Mutante von EnvZ (*envZ11*) identifiziert, die noch die Kinaseaktivität besitzt, aber nicht mehr die Phosphataseaktivität. Sie entspricht also der in dieser Arbeit verwendeten DegS-Hypermutable (275, 328). Diese durch das Mutantenallel *envZ11* hervorgerufene Hyperphosphorylierung von OmpR, hat einen negativen Einfluss auf das *malT* Gen. *malT* kodiert für den Regulator des Maltoseregulons. Eine Deletion des TCS EnvZ-OmpR hat dagegen keinen Einfluss auf die *malT* Expression und damit auf den Maltosestoffwechsel (31). Es besteht also auch die „Gefahr“, dass die Hyperphosphorylierung von DegU Prozesse beeinflusst, die nur ein Artefakt dieser Hyperphosphorylierung sind und unter physiologischen Prozessen nicht vorkommen.

1.3 Der Einfluss von Salzstress auf das DegU~P Regulon

In *B. subtilis* ist das gesamte DegS-DegU TCS entbehrlich für das Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen. Jedoch zeigte sich durch einen Vergleich zwischen dem DegU~P Regulon und dem Salz-Modulon (197, 299), dass 28 von 54 Genen des DegU~P Regulons durch Salzstress induziert werden. Über die Hälfte des DegU-Regulons ist also salzinduziert. Diese 28 Gene clustern in 10 polycistronischen und 5 monocistronischen Transkriptionseinheiten. Dies lässt vermuten, dass DegS zwar keine essentielle Salzsensorkinase ist, jedoch das DegS-DegU TCS eine Rolle während der Osmoadaptation spielen könnte. Dies wirft auch die Frage auf, warum nur circa die Hälfte des DegU Regulons salzinduziert ist und

die andere Hälfte nicht. Eine Antwort könnte durch die Promotorsequenz der Zielgene gegeben werden. Eventuell besitzen die nicht-salzinduzierten Gene eine bestimmte Promotorsequenz nicht, die aber für die Salzinduktion erforderlich ist. Dies impliziert, dass DegS nicht der Salzsensordetektor ist, sondern eine bestimmte DNA-Sequenz für die Salzinduktion verschiedener Gene verantwortlich ist. Für einige DegS-DegU regulierten Gene konnte gezeigt werden, dass diese auch noch von anderen Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Ein Beispiel hierfür ist *aprE*, welches neben DegU auch durch AbrB, ScoC, Spo0A und Hpr reguliert wird (126, 235, 246). Dies suggeriert, dass es noch weitere Determinanten gibt, die die Salzinduktion diverser Gene beeinflussen könnten.

Detaillierte Reporterstudien zu den verschiedenen Operons zeigten, dass die Promotoraktivität der Gene im Wildtyp in der Tat unter hyperosmotischen Bedingungen ansteigt, sogar in allen Fällen mindestens um den Faktor 2. Durch die Einführung der Deletionsmutante des DegS-DegU TCS erniedrigte sich das Expressionsniveau der meisten getesteten Gene unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen. Interessanterweise konnte aber für alle Gene immer noch eine Salzinduktion ermittelt werden. Dies bedeutet, dass *B. subtilis* auch in Abwesenheit von DegS-DegU in der Lage ist ein Salzstresssignal wahrzunehmen und eine spezifische Antwort zu generieren. Hierbei ist auch in Betracht zu ziehen, dass die untersuchten Gene neben der Salzregulation auch noch durch andere Regulatoren beeinflusst werden. So konnte zwischen dem DegS-DegU-Regulon und dem ComP-ComA Regulon ein Überlapp festgestellt werden, der sich auf die degradativen Enzyme und die Kompetenz bezieht (178). Einige DegU regulierten Gene werden durch mehrere Transkriptionsfaktoren reguliert (127, 235, 246). Interessanterweise tauchen auch 4 (*ispA*, *yfjA*, *ywqH* und die Gene des T7SS) der analysierten Gencluster in einer RemA Transkriptomanalyse auf, in der RemA für diese Gene als Aktivator identifiziert wurde (335).

Das stark verbesserte Wachstum der Hypermuranten in hypertonomem Medium, sowie die Salzinduktion des DegS-DegU TCS an sich deuteten weiter darauf hin, dass das System in irgendeiner Art und Weise in die Adaptation an Salzstress involviert ist. Es besteht die Möglichkeit, dass DegU~P unter hyperosmotischen Bedingungen Gene hoch reguliert, die zu einer verbesserten Adaptation und einem besseren Wachstum von *B. subtilis* führen. Eine detaillierte bioinformatische Analyse der untersuchten Gene konnte jedoch keine Genprodukte identifizieren, deren Funktionen eine offensichtliche Rolle während der Adaptation an Salzstress spielen oder das verbesserte Wachstum der Hypermuranten erklären könnten. Genprodukte, denen eine Funktion zugeordnet werden konnte, sind am Aufbau des Typ VII Sekretionssystem (*yukE-yueD*) beteiligt, sind für das Schwärmen von *B. subtilis* (*ycaA*) nötig oder sind Proteasen (*ispA* und *mpr*). Das einzige Operon, dessen Genprodukte möglicherweise in die Adaptation an hohe Salzkonzentrationen involviert sind, ist das *pgsB-C-A-E* Operon, welches für die Poly- γ -glutamat (PGA) Synthese nötig ist. PGA wird in Bakterien, wie *B. subtilis*, für die Absonderung von toxischen Metallionen verwendet, aber auch um die Resistenz gegen verschiedene Umweltstresse zu erhöhen (210). In *Archaeen* konnte gezeigt werden, dass PGA speziell für die Verringerung von hohen Salzkonzentrationen genutzt wird um das Überleben zu sichern (56, 129, 157). Es ist aber auch eine Quelle für Glutamat, wenn Bakterien in der späten stationären Phase hungern, da PGA durch die γ -Glutamyltransferase abgebaut werden kann (166). Es konnte für *B. subtilis* bereits gezeigt werden, dass die DegU-Hypermurante in der Lage ist die Expression des PGA-Syntheseoperons zu aktivieren. Ohne die DegU-Hypermurante hat der Wildtyp 168 keine ausreichenden Mengen an DegU~P um die

Expression zu aktivieren (244). Es wäre interessant die Menge an PGA in der Hypermutable und dem Wildtyp unter den getesteten Bedingungen zu analysieren und zu sehen ob die Hypermutable in der Tat mehr PGA produziert. Das PGA Syntheseoperon wird in *B. subtilis* nur unter physiologischen Bedingungen durch die DegU-Hypermutable hochreguliert. Unter hyperosmotischen Bedingungen tritt eine Repression des *pgsB-C-A-E* Operons durch die Hypermutable auf, sodass kein Glutamat zu PGA synthetisiert wird, sondern das Glutamat zum Fressen und zur Prolinsynthese zur Verfügung steht. Dies könnte das Wachstum von *B. subtilis* unter hyperosmotischen Bedingungen verbessern.

Eine Repression der Genexpression unter hyperosmotischen Bedingungen durch die Hypermutable wurde auch für die Gene *yfjA*, *yukE*, *yjHA* und *ywqH* ermittelt (Abb. 53). Dieser Einfluss könnte durch die unterschiedlichen Zugänglichkeiten bestimmter DNA Bereiche in Abhängigkeit von der Osmolarität des Mediums erklärt werden. In *B. subtilis* führen erhöhte NaCl-Konzentrationen zu einer Erhöhung des DNA Supercoiling (174), dies könnte wiederum dazu führen, dass DNA Sequenzen im Bereich der Promotoren nun für DegU~P zugänglich werden. Dadurch könnte die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor gestört werden, was eine verminderte Expression zur Folge hätte. Hierfür wäre es interessant zu testen, ob sich die Bindestellen von DegU~P unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen unterscheiden. Dies könnte über einen DNA-Bandshift und einen anschließenden DNase I Footprint erfolgen.

Für das *fla/che* Operon konnte gezeigt werden, dass DegU~P in hohen Konzentrationen eine reprimierende Wirkung hat und nur in Kombination mit SwrA einen positiven Einfluss auf das *fla/che* Operon hat. Im domestizierten Wildtyp 168 ist eine Punktmutation im *swrA* Promotorbereich vorhanden, der dazu führt, dass *swrA* nicht exprimiert wird (161). Diese Punktmutation ist im undomestizierten Wildtyp 3610 nicht vorhanden. Es wäre für die Reportergenfusionen von *yfjA*, *yukE*, *yjHA*, *ywqH* und *pgsB* interessant, ob sich das Expressionsmuster im Wildtyp 3610 mit den Hypermutablen unter hyperosmotischen Bedingungen ändert. Aber auch in Hinsicht auf dieses Expressionsmuster sollten die Ergebnisse die mit den Hypermutablen erzielt werden, immer mit Vorsicht betrachtet werden. Die Hypermutablen stellen ein nicht natürliches System dar, sodass diese Effekte auch artifiziell sein könnten. Es ist daher von Bedeutung auch den Einfluss der Deletionsmutante, in diesem Fall der $\Delta degSU$ Mutante zu analysieren. Dadurch wird ein wichtiger Hinweis gegeben, ob die Hypermutablen die entsprechenden Gene wirklich beeinflussen, da sie auch durch die Deletion des TCS beeinflusst werden. Im Fall der Gene die durch die Hypermutable unter hyperosmotischen Bedingungen runterreguliert werden, führt die Deletion des DegS-DegU TCS zu einer Reduktion der Promotoraktivität unter beiden getesteten Bedingungen. Dies zeigt, dass trotz der reprimierenden Wirkung der Hypermutablen, das DegS-DegU TCS wirklich einen Einfluss auf die Expression dieser fünf Gene hat.

Um die verschiedenen Expressionsmuster der analysierten Gene in Hinblick auf deren DegU~P Regulation verstehen zu können, ist es wichtig die DegU~P Bindestelle zu identifizieren. Über diese Bindestellen können weitere Erklärungen für die DegU~P Regulation eruiert werden. Es wurde versucht über bioinformatische Analysen putative Bindestellen von DegU~P für die analysierten Gene zu finden, dies stellte sich aber als sehr schwierig heraus. Dies liegt zum einen in der 2012 identifizierten Konsensussequenz der DegU Bindestelle, welche sehr variable ist (240). Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Ermittlung der DegU~P Bindestelle ist der Abstand zwischen Bindestelle und Transkriptionsstart. Für *aprE* wurde eine Distanz zwischen der DegU Bindestelle und dem Transkriptionsstart von 70 bp

bestimmt. Für *sacB* sogar ein Abstand von 113 bp. Die Funktionen der Gene aus dem DegU~P Regulon sind weitestgehend unbekannt, aber auch der Transkriptionsstart dieser Gene bleibt unbekannt. Dieser wäre aber wichtig, um die Region in der DegU~P bindet einzugrenzen. Der *sacB* Transkriptionsstart liegt zum Beispiel 198 bp vor dem Translationsstart. Sowohl für *sacB* (538 bp) als auch für einige Gene aus dem Überlapp des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons konnte eine lange intergene Region bestimmt werden (Abb. 53), sodass es viel Spielraum für eine DegU~P Bindestelle gibt. Der lange intergene Bereich und die nicht stark konservierte Konsensussequenz machen es schwierig DegU~P Bindestellen zu finden. Durch DNA Bandshifts und anschließende DNase I Footprints könnten für die Gene die DegU~P Bindestellen dennoch identifiziert werden.

Bei der Analyse der salzinduzierten Gene wurde auch das *aprE* Gen analysiert, welches durch Reporteranalysen als salzreprimiert identifiziert worden war (180). Unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen ist das *aprE* Gen jedoch unter hyperosmotischen Bedingungen induziert. Ein Grund für die Repression von *aprE* unter hyperosmotischen Bedingungen in der früheren Studie könnte das Medium sein. In der Studie wurde Sporulationsmedium genutzt um die salzabhängige Transkription dieses Gens in der stationären Phase zu analysieren (180). Durch diese Bedingungen können auch noch andere Faktoren einen Einfluss auf die Promotoraktivität haben, sodass es zu einer Repression unter hyperosmotischen Bedingungen kommt. Des Weiteren enthält das Sporulationsmedium Fleischextrakt, der eine Quelle für die kompatiblen Solute Carnitin und Prolin ist. Für die Expression salzinduzierter Gene in *B. subtilis* konnte eine Inhibition der Promotoraktivität durch kompatible Solute beobachtet werden (86, 134). Auch in *E. coli* wird die Promotoraktivität von *proU*, welches für den Transporter für Glycin-Betain kodiert, durch die externe Zugabe von Glycin-Betain in hyperosmotisches Medium reduziert (154). Weiterhin wurde für die *aprE* Transkriptionsanalyse von Kunst *et al.* eine *lacZ*-Fusion genutzt. Das LacZ Protein wird unter Stressbedingungen proteolysiert, sodass dies auch das Ergebnis des Promotoraktivitätsassays verfälschen kann (188). Auf Grund dieser Tatsachen wird angenommen, dass die Daten in der vorliegenden Studie die authentische Salzregulation der *aprE* Promotoraktivität widerspiegeln, da Minimalmedium und das salztolerante TreA Protein verwendet wurden.

1.4 Der Einfluss des DegS-DegU TCS auf das Typ VII Sekretionssystem

Das Typ VII Sekretionssystem (auch ESX System genannt) wurde zum ersten Mal in *Mycobacterium tuberculosis* identifiziert und spielt eine wichtige Rolle bei der Virulenz von *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* besitzt fünf dieser T7SS (ESX1-5). Das ESX-1 System sekretiert zwei kleine Enzyme EsxA und EsxB (298). Neben der Rolle der Virulenz in Mycobacterien ist das T7SS auch an einer speziellen Form der Konjugation in *Mycobacterium smegmatis* beteiligt (66). Während dieser Konjugation werden große chromosomale DNA Fragmente ausgetauscht. Das T7SS wurde ebenfalls in verschiedenen Actinobakterien und Firmicuten gefunden, wie zum Beispiel in *Staphylococcus aureus*. In *S. aureus* ist es für die Wirt-Pathogen Interaktion zuständig (48). In *B. subtilis* konnten Proteine identifiziert werden, die für ein T7SS kodieren (19). Dabei weisen die Proteine eine Sequenzhomologie und/oder vorausgesagte strukturelle Ähnlichkeiten mit bekannten Proteinen aus dem T7SS in *M. tuberculosis* und *S. aureus* auf. Das T7SS wird durch die Genprodukte von 7 Genen (*yukE-yukD-yukC-yukB-yueB-yueC-yueD*) aufgebaut. Detaillierte Analysen identifizierten YukE als das sekretierte Protein

und YukB als ATPase (143). YueB, YueC und YukC bilden vermutlich die Membrankomponenten. In *B. subtilis* ist die Sekretion von Yuke von allen Komponenten des *yukE-yueD* Operons abhängig (19). Tiling-Array Analysen zeigen, dass das System ein sehr hohes Expressionsniveau besitzt (230). Auf Grund von Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass das T7SS während der stationäre Phase im 3610 Wildtyp in erhöhten Mengen produziert wird, jedoch nicht im Wildtyp 168. Dies liegt begründet in zu geringen Mengen an DegU~P (19). Interessanterweise konnte eine Repression des T7SS unter Bedingungen wie Kälte, oxidativem Stress und Biofilmbildung festgestellt werden (230). Allerdings wurde ein positiver Einfluss des Biofilmaktivators RemA nachgewiesen (335).

Bei der detaillierten Analyse der gemeinsamen Gene aus dem DegU~P Regulon und des Salz-Modulons wurde auch das T7SS als salzinduziert und DegU~P abhängig identifiziert (Tabelle 2). Meine Reporterstudien zeigten, dass der Promotor des T7SS kodierenden Operons in Minimalmedium und unter Salzstressbedingungen im Wildtyp 168 aktiv ist (Abb. 25). Dies steht im Kontrast zu der bisher publizierten Arbeit über das T7SS, bei dem behauptet wurde, dass das T7SS im Wildtyp 168 nicht exprimiert wird (19). Hier erfolgte der Nachweis auf Proteinebene über einen Western Blot. Es besteht also die Möglichkeit, dass das System im Wildtyp 168 zwar transkribiert wird, aber nachfolgend nicht in Proteine übersetzt wird. Um die Präsenz und Funktionsfähigkeit des T7SS unter Salzstressbedingungen in *B. subtilis* nachzuweisen, könnte eine Western Blot Analyse mit Zellen durchgeführt werden, die ein FLAG-Tag markiertes Yuke Protein produzieren. Proben des Zellextraktes und des Überstandes des Wildtyps unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen könnten gezogen werden. Ist das T7SS in *B. subtilis* unter den getesteten Bedingungen aktiv, müsste Yuke im Überstand detektierbar sein. Interessanterweise tauchte bei der Analyse der Gene aus dem Überlapp des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons ein weiteres Gen (*yfjA*) auf, welches ein sogenanntes WXG-Motiv besitzt. Die T7SS werden anhand der sekretierten Proteine identifiziert, welche alle ein zentrales WXG Motiv besitzen. In einer früheren Studie wurde schon vermutet, dass YfjA ebenfalls durch das T7SS sekretiert werden könnte (250). Neben einer Yuke-FLAG-Tag Fusion wäre auch eine YfjA-FLAG-Tag Fusion interessant um zu analysieren, ob dieses Protein ebenfalls über das T7SS sekretiert wird.

Weiterhin wiesen die Reporterstudien auf eine entscheidende Rolle des DegS-DegU TCS bei der Regulation des T7SS hin. Durch die Deletion des DegS-DegU TCS wird das *yukE-yueD* Operon nicht mehr voll exprimiert. Durch die Hypermutanten wird die Expression unter isoosmotischen Bedingungen gesteigert, was auch schon früher gezeigt worden war (19). Erhöhte DegU~P Konzentrationen haben dahingegen unter hyperosmotischen Bedingungen eine reprimierende Wirkung auf die Expression von *yukE-treA*. Es wäre möglich, dass unter hyperosmotischen Bedingungen eine andere Bindestelle für DegU~P zugänglich wird, die in der Nähe des Promotors liegt und so eine effektive Bindung der RNA-Polymerase verhindert. Wie bereits erwähnt wäre es interessant den Einfluss von SwrA auf die Promotoraktivität in Kombination mit den Hypermutanten zu analysieren. Für das *fla/che* Operon war gezeigt worden, dass erhöhte Konzentrationen von DegU~P ohne die Bindung von SwrA eine reprimierende Wirkung haben (218).

Auf Grund der Repression des T7SS unter Biofilm-induzierenden Bedingungen in den Tiling-Array Analysen (230) wurde der Einfluss der Hauptregulatoren der Biofilmbildung (SinR und SinI) analysiert. SinR ist ein direkter Repressor für das *eps* Operon, sowie des *tapA-sipW-tasA* Operons. Durch die Repression dieser beiden Operons ist *B. subtilis* nicht in der Lage einen robusten Biofilm zu bilden. Die

Aktivität von SinR kann durch SinI antagonisiert werden, indem ein SinI-SinR Komplex gebildet wird. Ein weiterer Indikator, für eine mögliche Rolle des T7SS im Biofilm von *B. subtilis*, ist die aktivierende Wirkung von RemA auf das T7SS, die durch Transkriptomdaten bestimmt worden war (335). RemA ist der aktivierende Regulator für die Biofilmbildung in *B. subtilis*.

Unter isoosmolaren Bedingungen konnte ein Anstieg der Promotoraktivität von *yukE-treA* festgestellt werden, wenn SinR deletiert wurde (Abb. 29). Dagegen war die Promotoraktivität des Wildtyps und der Deletionsmutante des T7SS unter hyperosmotischen Bedingungen nahezu identisch. SinR ist also in der Lage unter isoosmotischen Bedingungen an den Promotorbereich von *yukE* zu binden und so dessen Expression zu reprimieren. Unter hyperosmotischen Bedingungen hat das Vorhandensein oder die Abwesenheit von SinR keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Dies könnte an der bereits diskutierten Veränderung der DNA Topologie unter hochosmolaren Bedingungen liegen. Entweder fördert das Supercoiling der DNA die Bindung der RNA-Polymerase sodass SinR verdrängt wird oder die Bindestelle von SinR wird durch das Supercoiling so verändert, dass SinR nicht mehr binden kann (Abb. 39 rechter Teil) (5, 174). Durch die Deletion von SinI konnte unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe Promotoraktivität des T7SS kodierenden Operons ermittelt werden und auch unter hyperosmotischen Bedingungen war die Promotoraktivität reduziert. Dies bestätigt die Repression des *yukE* Promotors durch SinR, da SinI der Antagonist von SinR ist. Wird SinI also deletiert, kann SinR dauerhaft an die DNA binden und so die Promotoraktivität von *yukE* hemmen. Durch die Deletion von RemA wurde die Promotoraktivität unter isoosmotischen Bedingungen ebenfalls deutlich reduziert (Abb. 29).

Bereits im Wildtyp findet unter physiologischen Bedingungen eine starke Expression von *yukE-treA* statt. Vermutlich wird die reprimierende Wirkung von SinR durch DegU~P, vor allem durch erhöhte Konzentrationen an DegU~P, aufgehoben. Es ist möglich, dass der *yukE* Promotor unter isoosmolaren Bedingungen durch SinR inhibiert wird. Während der exponentiellen Phase ist die Konzentration an SlrR noch gering, sodass SinR von SlrR nicht gebunden wird. Sobald SinI exprimiert wird und die SlrR Menge ansteigt, wird ein SlrR-SinR Heterodimer gebildet. Dieser Komplex bindet an die DNA und nicht mehr das SinR Homodimer. In einem dritten Schritt entfernt DegU~P den Heterodimer in Anwesenheit der RNA-Polymerase von dem *yukE* Promotor. Dadurch kann DegU~P selber an den *yukE* Promotor binden und die Expression aktivieren. Dieser Vorgang ist nur durch das Heterodimer möglich, nicht wenn SinR alleine an den *yukE* Promotor bindet (Abb. 39). Dieses Szenario konnte bereits für den *degU_{P3}* Promotor gezeigt werden (242). Zusammenfassend haben RemA, DegU~P und SinI unter physiologischen Bedingungen eine aktivierende Wirkung und SinR eine reprimierende Wirkung. Dieses Szenario ändert sich unter hyperosmotischen Bedingungen, da DegU~P und RemA einen negativen Einfluss haben und SinR keinen Einfluss mehr hat. Um den zugehörigen Regulationsmechanismus nachzuweisen, müsste man die *yukE-treA* Fusion in den Hypermутanten in Kombination mit einer *slrR* Deletionsmutante vermessen. Durch diese Deletionen dürfte SinR nicht mehr vom *yukE* Promotor abgelöst werden und so die Expression auch in der Hypermутante auf einem niedrigen Niveau lassen. Im Gegensatz dazu würde die Deletion von *sinR* zu einer direkten Aktivierung von *yukE-treA* in der Hypermутante führen.

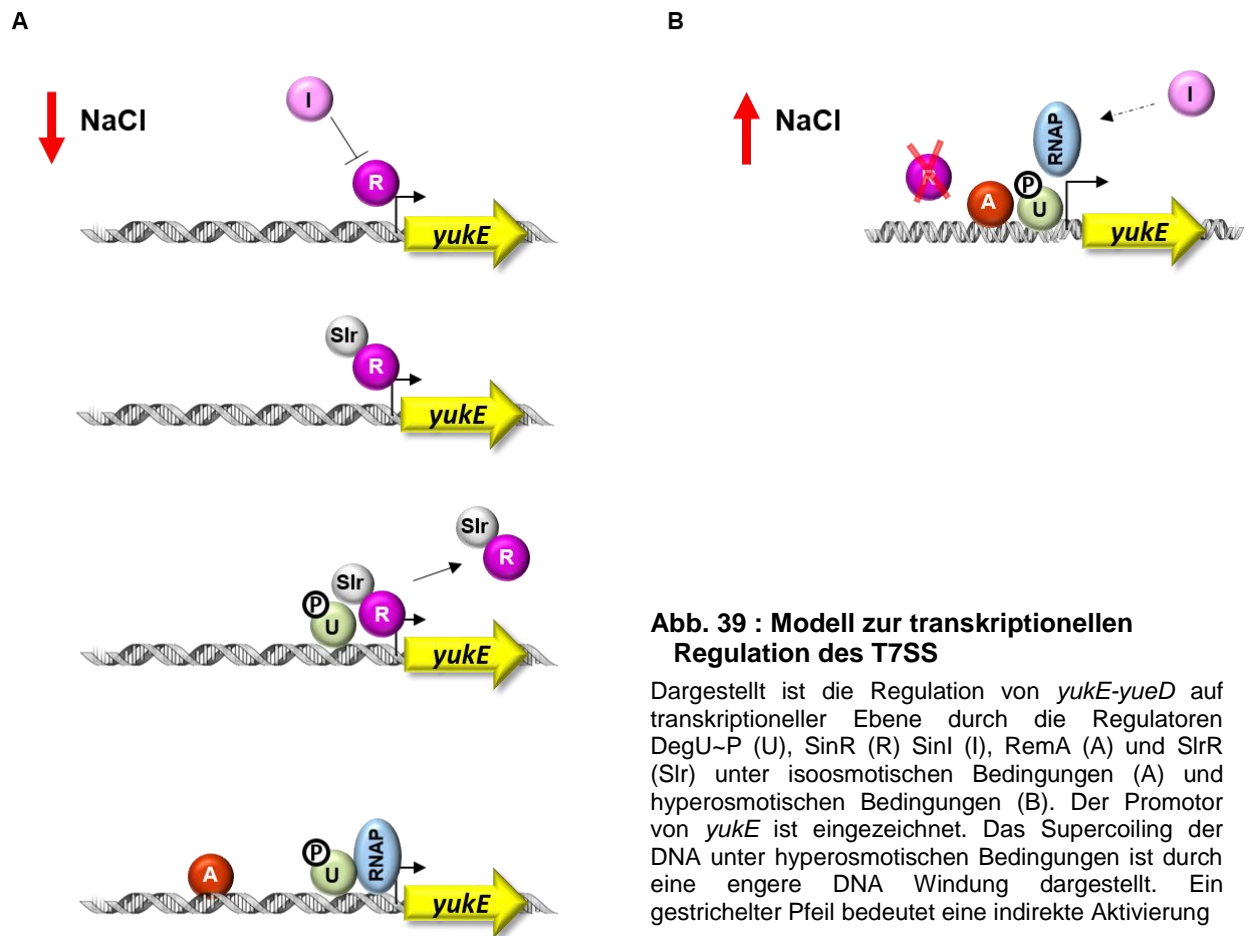


Abb. 39 : Modell zur transkriptionellen Regulation des T7SS

Dargestellt ist die Regulation von *yukE-yueD* auf transkriptioneller Ebene durch die Regulatoren DegU~P (U), SinR (R) SinI (I), RemA (A) und SlrR (Slr) unter isoosmotischen Bedingungen (A) und hyperosmotischen Bedingungen (B). Der Promotor von *yukE* ist eingezeichnet. Das Supercoiling der DNA unter hyperosmotischen Bedingungen ist durch eine engere DNA Windung dargestellt. Ein gestrichelter Pfeil bedeutet eine indirekte Aktivierung

Um die Regulation des T7SS besser verstehen zu können sind noch weitere Experimente nötig:

- (i) Der salzinduzierbare Promotor muss durch eine Primer-Extension Analyse identifiziert werden.
- (ii) Die Bindestellen von SinR und DegU~P sowie von RemA an den *yukE* Promotorbereich unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen können durch einen DNA Bandshift und DNase I Footprint identifiziert werden. Dadurch kann zum einen geklärt werden, ob die Bindestellen überlappen und so ein Regulator den anderen Regulator ausschließt. Zum anderen kann gezeigt werden, ob eine Bindestelle mit dem Promotor überlappt wodurch die reprimierende Wirkung der Regulatoren unter hyperosmotischen Bedingungen erklärt werden könnte.
- (iii) Die Auswirkungen eines SwrA positiven Stammes auf die *yukE-treA* Expression, im Besonderen in den DegS- und DegU-Hypermotanten, könnten Aufschluss über die inhibierende Wirkung von DegU~P unter hyperosmotischen Bedingungen geben.
- (iv) die Tiling-Array Daten deuten darauf hin, dass das T7SS unter Biofilm-induzierenden Bedingungen reprimiert wird (230). Jedoch deuten die Reportergenanalysen in meiner Studie daraufhin, dass die Biofilmregulatoren einen positiven Einfluss auf die Expression haben. Daraus leitet sich die Frage ab, ob unter Biofilm-induzierenden Bedingungen ein anderes Regulationsmuster der diversen Biofilmregulatoren auf die *yukE-treA* Aktivität erkennbar ist. Dafür wäre es interessant die *yukE-treA* Fusion im undomestizierten Wildtyp 3610 unter Biofilm-induzierenden Bedingungen, als auch unter hyperosmotischen Bedingungen zu analysieren.

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass das T7SS eine Rolle im Biofilm innehat. Zum einen konnte der Einfluss der Biofilmregulatoren SinR, SinI und RemA bestätigt werden. Weiterhin hat DegU~P unter physiologischen Bedingungen eine aktivierende Wirkung auf die Promotoraktivität des T7SS. DegU~P hat auch einen Einfluss auf die Biofilmbildung indem es die Expression des *eps* Operon sowie des *tapA-sipW-tasA* Operon inhibiert und die Promotoraktivität des *bslA* Gens aktiviert (205). Alle drei Operons sind nötig für die Ausbildung eines robusten Biofilms (227, 248, 270). Letztendlich wird das T7SS durch osmotischen Stress induziert, welcher auch in einem Biofilm herrscht. Der Biofilm von *B. subtilis* wird von dem Protein BslA abgedeckt. Dieses Protein ist hydrophob, sodass kein Wasser von „oben“ in den Biofilm dringen kann (132). Die Exopolysaccharidmatrix im Biofilm baut jedoch einen osmotischen Druck auf, der dazu führt, dass Wasser von der Agaroberfläche, auf der sich der Biofilm befindet, in den Biofilm einströmt, wodurch sich der Biofilm ausbreitet (284). Interessanterweise konnte ein weiterer Zusammenhang zwischen der Biofilmbildung und osmotischen Stress beobachtet werden. SinR ist der Hauptregulator für die Gene, deren Produkte für den Biofilm wichtig sind. RemA ist ein Aktivator für diese Gencluster und antagonisiert die reprimierende Wirkung von SinR. Der Aktivator RemA hat aber nicht nur einen Einfluss auf diese Gene, sondern auch auf die Aufnahmesysteme für kompatible Solute, OpuA, OpuB und OpuC (335). Dabei bindet RemA direkt an den Promotor vor dem *opuA* Gencluster und aktiviert somit dessen Expression [T. Hoffmann und E. Bremer unveröffentlichte Daten; (335)]. Das bisher einzige Protein, welches durch das T7SS sekretiert wird ist YukE. YukE besitzt das typische WXG Motiv für Proteine die durch das T7SS transportiert werden, jedoch keine weitere Domäne die Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zulassen würde. Auf Grund dieser Daten wäre es interessant den Einfluss des T7SS auf den Biofilm von *B. subtilis* zu analysieren. Dies kann zunächst mit einer Deletionsmutante des T7SS geschehen. Eine weitere Möglichkeit ist zu testen, wo das sekretierte Protein YukE im Biofilm lokalisiert. Dazu könnte eine spezifische Markierung des Proteins (GFP-Tag) erfolgen, die dann im Biofilm durch Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert wird.

2 Erweiterung des DegU~P Regulons

Während einer früheren Promotion konnte das *yqiHIK* Operon ebenfalls als Zielgen für DegU~P identifiziert werden, jedoch taucht keines der Gene aus diesem Operon in einem DegU-Regulon auf (167, 197, 241). Es wurde aber eine eindeutige Abhängigkeit des *yqiHIK* Genclusters von DegU~P nachgewiesen [Abb. 30 und (86)]. Weiterhin wiesen Gene (*yfkN*, *yfjA*, *yukE*, *yjHA*, *ywqH*, *pgsB*), die im Wildtyp salzinduzierbar sind in den DegU- und DegS-Hypermutablen keine Salzinduktion mehr auf (Abb. 22). Diese Ergebnisse zeigen, dass das DegS-DegU TCS unter hyperosmotischen Bedingungen eine Rolle spielt. Man muss davon ausgehen, dass das Regulon von DegU~P deutlich erweitert werden muss, da bisher DegU~P regulierte Gene, deren Transkription hauptsächlich unter hyperosmotischen Bedingungen stattfindet, nicht berücksichtigt wurden. Um dieses salzabhängige DegU~P Regulon umfänglich zu beschreiben, wurden während der vorliegenden Studie Microarray Analysen geplant. Dafür wurden Proben des Wildtyps 168, der *degSU* Deletionsmutante und der DegS-Hypermutable [*degS200(Hy)*] in Helmann Minimalmedium mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert (Vorexperimente, die die Salzinduktion und das Wachstum dieser drei Stämme in HMM analysierten sind in Abb. 58 und Abb. 59 aufgeführt). Weiterhin sollte eine kürzlich analysierte DegU Mutante genutzt

werden, die verhindert das DegU phosphoryliert werden kann (*degU146_{D56N}*) um das DegU-Regulon von dem DegU~P Regulon zu unterscheiden. Diese Analyse wird einerseits bereits bekannte Gene des Regulons den regulatorischen Einflüssen von DegU oder der phosphorylierten Form DegU~P zuordnen. Darüber hinaus wird das DegU~P Regulon um die salzabhängigen Gene erweitert.

3 Analyse der DegS-DegU abhängigen Expression des *yqiHIK* Operons

In dem Hauptteil meiner Dissertation ging es um die Regulation des osmotisch induzierbaren *yqiHIK* Operons, sowie dessen Regulation durch das DegS-DegU Zwei-Komponenten System. Das *yqiHIK* Operon wurde erstmalig 2012 im Hinblick auf dessen transkriptionelle Regulation untersucht (86, 87). Mittels bioinformatischer Analysen wurde gezeigt, dass das Operon für ein putatives Lipoprotein (YqiH), eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase (YqiI) und eine putative Glycerophosphodiester Phosphodiesterase (YqiK) kodiert. Dieses Operon geriet in den Fokus der Forschung auf Grund der hohen Expression von *yqiI* in den Transkriptomdaten salzgestresster Zellen (230, 299), aber auch beim Wachstum im Chemostat mit Salzstress (172). Damit ist YqiI die einzige bekannte Amidase mit einer Amidase_3 Domäne die salzinduzierbar ist (Tabelle 7). Basierend auf Aminosäure Sequenzvergleichen gruppiert die Pfam-Datenbank N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen in vier verschiedene Familien: CHAP Familie (Cystein/Histidin-abhängige Amidohydrolase/Peptidase) (PF05257), Amidase_2 (PF01510), Amidase_3 (PF01520) und Amidase_5 Familie (PF05382). Alle vier Domänen kommen typischerweise in N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen vor und bilden die katalytische Domäne dieser Amidase. Auch unter den N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen mit einer Amidase_2 Domäne ist keine Amidase in allen drei Transkriptomstudien so stark salzinduziert.

Tabelle 7: Expression der Amidasen in verschiedenen Transkriptomanalysen

Gen	Domänen ^a	Funktion	Steil <i>et al.</i> ^b 1,2 M NaCl/ 0 M NaCl (299)	Tiling -Array ^c 1,2 M NaCl/ 0 M NaCl (230)	Sysmo Projekt ^d 1,2 M NaCl/ 0 M NaCl (172)
YqiI	Signalpeptid	Abbau von Zellwandmaterial <i>in vitro</i>	6,8	17,3	109,9
CwIC	SPOR Domäne (für Peptidoglykan Bindung zuständig)	Sporulationsspezifische Amidase	0,44	0,3	0,01
CwID	1 TMD (laut Swiss Prot sekretiert)	Keimungsspezifische Amidase	0,27	0,9	0,08
LytC	Signalpeptid und 3 Zellwand Bindedomänen (cell wall binding repeat 2)	Vegetative Zellwand Hydrolase Mutanten sind beeinträchtigt in der Motilität	0,88	0,9	0,51
YrvJ	Signalpeptid, und SH3b Domäne (kann für die Membranbindung zuständig sein)	Bisher nicht experimentell analysiert	0,91	0,5	0,99

XlyA	LysM Domäne und PG_binding_1 Domäne	PBSX Prophage-vermittelte Lyse	0,88	2,2	0,27
XlyB	LysM Domäne und PG_binding_1 Domäne	PBSX Prophage-vermittelte Lyse	1,75	1,3	0,40
BlyA	SH3b Domäne (kann für die Membranbindung zuständig sein)	SPβ –vermittelte Lyse	0,91	1,4	1,23
CwlH	PG_binding_1 Domäne	Zellwand Metabolismus während der Sporulation	0,57	0,6	1,69
CwlA	PG_binding_1 Domäne	Minor Autolysin	0,66	1,2	0,76

^a Alle 5 oberen Proteine haben eine Amidase_3 Domäne, die nicht extra aufgeführt wird, die unteren 5 eine Amidase_2 Domäne

^b Der Wildtyp 168 wurde in dieser Studie in HMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet

^c Der Wildtyp 168 Trp⁺ wurde in dieser Studie in SMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet

^d Der Wildtyp 168 Trp⁺ wurde in dieser Studie in M9 Minimal Medium mit 1 g L⁻¹ Glukose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Des Weiteren wurden die Kulturen mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und in der „steady state“ Phase geerntet.

Das *yqiHIK* Gencluster wird von einem Promotor vor *yqiH* transkribiert und hinter *yqiK* ist eine Terminatorsequenz zu finden. Durch ein „Operon Mapping“ konnte gezeigt werden, dass alle drei Gene eine Transkriptionseinheit bilden. Ein *in vitro* Zymogramm bestätigte die Peptidoglykan-abbauende Fähigkeit des YqiI Proteins (87). Durch die detaillierte Analyse der Transkriptionsregulation des *yqiH* Promotors konnten folgende regulatorische Elemente identifiziert werden (86, 327):

- (i) Das *yqiHIK* wird von einem SigA-abhängigen Promotor transkribiert.
- (ii) Durch die Analyse der *yqiHIK* Promotoraktivität in SMM mit steigenden Salzkonzentrationen konnte ein neues Expressionsmuster identifiziert werden. Dabei wird *yqiH—treA* bis 0,7 M NaCl im Medium auf einem basalen Transkriptionsniveau exprimiert. Durch höhere Konzentrationen steigt die Expression linear zur externen Osmolarität an.
- (iii) verschiedene kompatible Solute (Glycin-Betain, Cholin und Prolin-Betain) reprimieren die *yqiHIK* Promotoraktivität.
- (iv) Der Biofilmregulator SinR bindet an zwei DNA-Regionen vor dem *yqiHIK* Transkriptionsstart und reprimiert die Promotoraktivität.
- (v) Der Transkriptionsfaktor AbrB hat einen indirekten Effekt auf die Promotoraktivität, durch die Deletion kann das *yqiHIK* Gencluster unter hyperosmotischen Bedingungen nicht mehr voll induziert werden.
- (vi) der Hauptregulator Spo0A reprimiert unter hyperosmotischen Bedingungen die *yqiHIK* Expression, die ebenfalls den SigA-Promotor involviert.
- (vii) der Hauptregulator DegU~P aktiviert die *yqiHIK* Expression unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen.

3.1 Regulation von *yqiHIK* durch das DegS-DegU TCS auf transkriptioneller Ebene

Abb. 40 zeigt das putative Modell zur DegS-DegU vermittelten Regulation des *yqiHIK* Operons und wird im weiteren Verlauf näher aufgeführt.

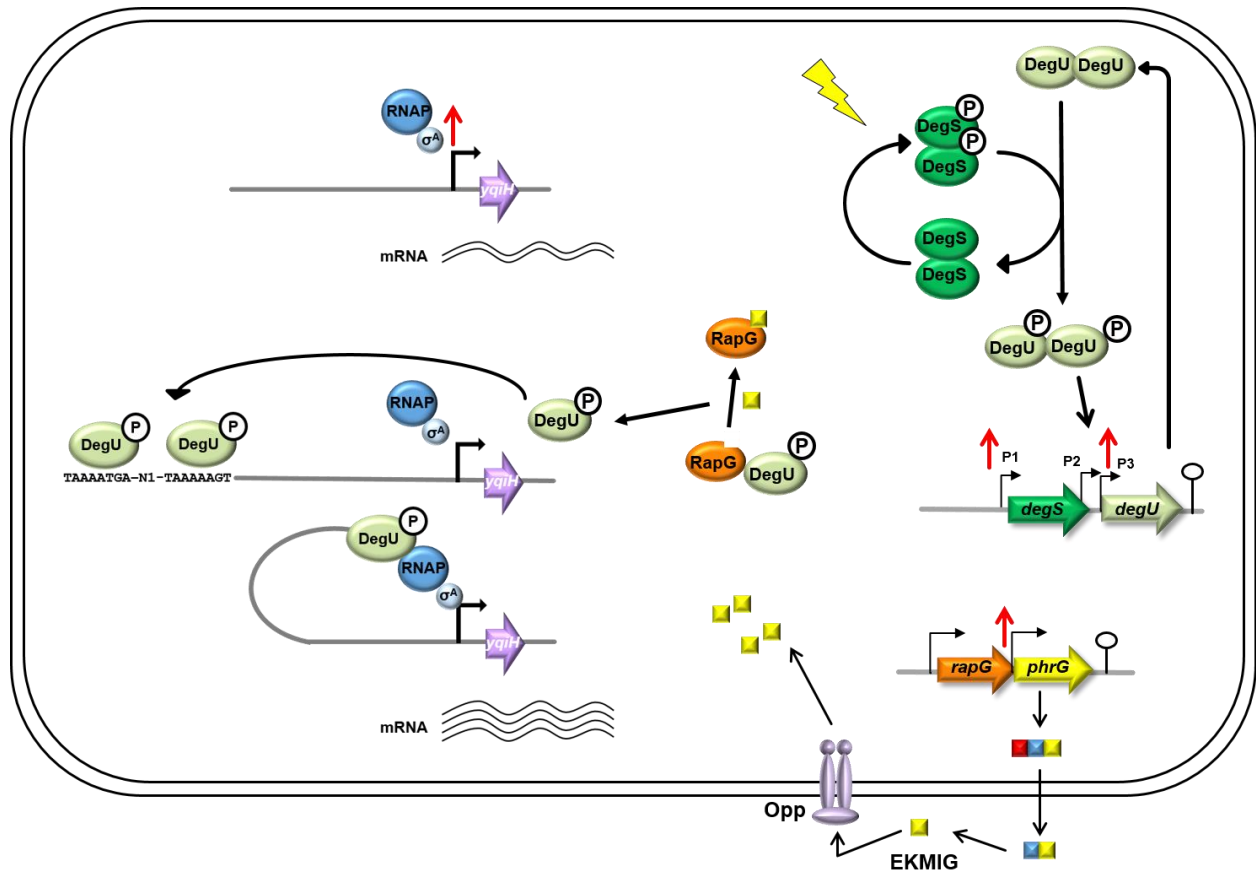


Abb. 40: Modell zur DegS-DegU abhängigen Regulation des *yqiHIK* Operons

Abgebildet ist die Expression des *degSU* Operons, welches durch Salztstress (rote Pfeile) induziert wird. Dabei hat DegU~P einen positiven Einfluss auf dessen eigene Expression. Das postulierte Modell (86) zur DegU abhängigen Regulation über RapG-PhrG konnte nicht bestätigt, aber auch nicht ausgeschlossen werden, sodass es transparent dargestellt wird. Ohne Bindung von DegU~P wird *yqiHIK* auf einem bestimmten Transkriptionsniveau exprimiert, durch Bindung von DegU~P an die gezeigte Bindestelle findet ein DNA Bending statt und DegU~P hilft der RNA-Polymerase bei der Bindung oder Transkriptionsinitiation. Durch die Bindung von DegU~P wird *yqiHIK* auf einem höheren Niveau exprimiert. RNAP steht für die RNA-Polymerase mit σ^A gebunden. Das rote Quadrat stellt die Signalsequenz von PhrG dar, das blaue das Propeptid und die gelben Quadrate stellen das reifen Pentapeptid PhrG dar. Die Sequenz des Pentapeptids ist abgebildet. Terminatoren und Promotoren sind eingezeichnet.

Während meiner Promotion konnte ich den Einfluss des DegS-DegU TCS auf *yqiHIK* bestätigen und weiterführende Experimente identifizierten eine DegU~P Bindestelle in einem großen Abstand zum Transkriptionsstart (Abb. 30 und Tabelle 5). Während einer früheren Promotion wurde ein Modell zur DegS-DegU abhängigen Regulation von *yqiHIK* postuliert (86). Dieses Modell ging von der Hypothese aus, dass die Regulation von DegS-DegU über das RapG-PhrG System erfolgt, da beide Systeme, sowie das *yqiHIK* Operon salzinduzierbar sind. Für *yqiHIK* sollte getestet werden, ob dieser Regulationsmechanismus auch unter hyperosmotischen Bedingungen zutrifft. Eine weitere Vermutung die gestellt wurde, war, dass die Deletion von *rapG* dazu führt, dass DegU~P ungehindert an die Promotorregion von *yqiHIK* binden kann. Dadurch könnte das Operon bereits durch moderater NaCl-

Konzentrationen induzierbar sein. Jedoch konnte das Model unter den getesteten Bedingungen nicht bestätigt werden, da die Deletion des *rapG-phrG* Operons keinen Einfluss auf die Expression von *yqiHIK* hat (Abb. 37). Daraus können zwei mögliche Rückschlüsse gezogen werden: (i) das RapG-PhrG System hat unter diesen Bedingungen nur einen Feinabstimmungseffekt, der vergleichbar schon für andere Rap-Phr Systeme in *B. subtilis* nachgewiesen worden war (255). (ii) die experimentellen Bedingungen die in diesem Experiment gewählt wurden, führten zu einer zu hohen DegU~P Konzentration und die Mengen an RapG reichten nicht aus um DegU~P effektiv zu inhibieren.

Das salzabhängige Regulationsprofil von *yqiHIK* zeigte, dass eine lineare Salzabhängigkeit des *yqiH* Promotors im Wildtypintergrund erst ab Salzkonzentrationen 0,8 M NaCl stattfand. Dagegen fand eine Induktion des *yqiHIK* Operons schon bei geringeren Salzkonzentrationen in Gegenwart erhöhter DegU~P Konzentrationen (Hypermutanten) statt (Abb. 32). Dabei spiegelte dieses neu identifizierte Expressionsmuster von *yqiHIK* direkt die Konzentration an DegU~P wider. Das DegS-DegU TCS wird durch den P1 Promotor auf einem geringen basalen Transkriptionsniveau exprimiert (Abb. 11), welches linear zur externen Salzkonzentration ansteigt. Diese geringe Konzentration an DegU~P reicht nicht aus um *yqiHIK* bei niedrigen NaCl-Konzentrationen zu exprimieren. Dahingegen wird der *degU_{P3}* Promotor zunächst wie der *yqiHIK* Promotor nur auf einem basalen Niveau exprimiert und erst ab einer Salzkonzentration von 0,8 M NaCl im Medium wird die Expression durch Salz induziert. Das bedeutet, dass unterhalb einer NaCl-Konzentration von 0,8 M noch zu wenig DegU~P Protein durch das DegS-DegU TCS synthetisiert wird. Erst durch die DegU- und DegS-Hypermutante sind ausreichende Mengen von DegU~P vorhanden um die Transkription von *yqiHIK* durch moderate NaCl-Konzentration zu induzieren. Interessanterweise ist zwischen der DegU-Hypermutante und der DegS-Hypermutante ein Unterschied in dem Expressionsniveau von *yqiHIK* messbar. In der DegS-Hypermutante wird der *yqiHIK* Promotor unter hyperosmotischen Bedingungen doppelt so stark exprimiert wie in der DegU-Hypermutante. Die DegU-Hypermutante [*degU32(Hy)*] trägt eine Punktmutation im N-terminalen Bereich des *degU* kodierenden Bereichs (H12L). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne zwar nicht an der DNA-Bindungsaktivität von DegU~P beteiligt ist, aber die Interaktion mit SwrA beeinträchtigt. Diese Interaktion ist wichtig für die DegU~P Aktivität, da ohne diese Interaktion DegU~P auch als Repressor agieren kann (240). Es besteht also die Möglichkeit, dass die DegU-Hypermutante durch die fehlende Interaktion mit SwrA nicht seine volle aktivierende Wirkung auf den *yqiHIK* Promotor hat. Man kann argumentieren, dass *swrA* in dem Wildtyp 168 nicht exprimiert wird und so das Genprodukt nicht mit DegU~P interagieren kann (55). Die Mutation die zur Inaktivierung der *swrA* Transkription führt, ist aber nur eine Punktmutation die mit einer hohen Frequenz (10^{-4}) wieder revertieren kann (161). Es wird vermutet, dass in einer *B. subtilis* Wildtyp 168 Kultur ein Gemisch aus SwrA positiven und negativen Zellen vorliegt, sodass DegU~P in den SwrA-positiven Zellen mit SwrA interagieren kann und die Expression von *yqiHIK* aktiviert. Während der TreA-Aktivitätsbestimmung wird aber ein Gemisch aus Zellen gemessen, in denen SwrA mit DegU~P interagieren kann und Zellen in denen keine Interaktion stattfindet. Dadurch wird nicht die komplette Aktivität des *yqiHIK* Operons erfasst. Durch die DegS-Hypermutante [*degS200(Hy)*] wird die Interaktion von DegU~P mit SwrA nicht unterbrochen, da das DegU Protein an sich nicht beeinflusst wird, sondern nur nicht dephosphoryliert werden kann. Durch die DegS-Hypermutante wird dadurch ein höheres Expressionsniveau erreicht. Dadurch stellt sich die Frage, ob die volle Aktivierung des *yqiHIK* Promotors durch eine Kombination der DegS-Hypermutante

mit einem SwrA positiven Hintergrund noch weiter gesteigert werden kann, da in allen Zellen SwrA vorliegt und keine Inhibition der Interaktion durch die *degU32(Hy)* Mutation vorliegt. Letztendlich könnte durch die Nutzung einer *degU146* Mutante, in der das konservierte Aspartat56 gegen ein Asparagin ausgetauscht wurde, für *yqiHIK* eindeutig bewiesen werden, dass es nur durch DegU~P aktiviert werden kann. Diese Mutante führt zu einem nicht mehr phosphorylierbaren DegU Protein (72).

3.1.1 Bindung von DegU~P an den *yqiHIK* Promotorbereich

Für die Promotoren von *ycdA*, *degU* und *aprE* wurden für die Bindung von DegU~P „low affinity“ Bindestellen gefunden, da nur eine Bindung durch hohe Konzentrationen von DegU~P stattgefunden hat. An den *flgM* Promotor konnte DegU~P auch in geringen Konzentrationen binden (142). Für DegU ist bekannt, dass neben der phosphorylierten Form auch die unphosphorylierte Form Dimere ausbildet, um an die Promotorbereiche von Zielgenen zu binden (240). In dieser Arbeit konnte mittels Mutagenesestudien eine Bindestelle für DegU~P an den *yqiHIK* Promotorbereich identifiziert werden. Hierbei handelte es sich vermutlich um eine „high affinity“ Bindestelle, da *yqiHIK* auch schon durch moderate Mengen DegU~P im Wildtyp 168 unter hyperosmotischen Bedingungen angeschaltet wurde. Wird jedoch diese Bindestelle mutiert, fand im Wildtyp keine Expression mehr statt. Erhöhte man die Menge an DegU~P fand immer noch eine leichte Aktivierung der Expression von *yqiHIK* statt (Tabelle 5 und Abb. 34). Das heißt, dass es neben der identifizierten Bindestelle noch eine weitere Position in dem stromaufwärts gelegenen Bereich des *yqiHIK* Promotors geben muss, an die DegU~P bindet. Diese ist vermutlich eine „low affinity“ Bindestelle, da erst die Hypermutanten zu einer Erhöhung der Expressionsstärke führen. Es ist bereits aus der Literatur bekannt, dass DegU~P an Sequenzwiederholungen bindet. DegU gehört zu der NarL Familie der Antwortregulatoren, welche oft Dimere in einer symmetrischen Form ausbilden. Geht man davon aus, dass dies auch der Fall für DegU ist, würde DegU an symmetrisch angeordnete Sequenzen binden (also sogenannte head-to-head Sequenzwiederholungen). Der einzige bisher bekannte Fall ist der Promotor von *comK*, der in einer inversen Sequenzwiederholung von der unphosphorylierten Form von DegU gebunden wird. Die bisher bekannten DegU~P Bindestellen sind alle in einer head-to-tail Gliederung angeordnet. Durch die genaue Inspektion des *yqiHIK* Promotorbereichs konnte neben der identifizierten Bindestelle (TAAAATGA) mit einem Abstand von einem Nukleotid in einer head-to-tail Anordnung der andere Teil der Sequenzwiederholung gefunden werden (TAAAAAGT). Eine weiter stromabwärtsgelegene Bindestelle in der AT-reichen untranslatierten Region kann ausgeschlossen werden. Würde weiter stromabwärts noch eine weitere Bindestelle für DegU~P liegen, würde man erwarten, dass auch in der letzten Verkürzung der AT-reichen Region noch eine leichte *yqiHIK* Promotoraktivität in den Hypermutanten zu messen ist. Durch die Verkürzungen der AT-reichen Region wurde gezeigt, dass durch die Halbierung der AT-reichen Region auch in der Hypermutante keine Expression mehr stattfand (Tabelle 4). Um zu beweisen, dass auch das zweite Oktamer für die DegU~P Bindung nötig ist, könnte eine weitere gerichtete Mutagenese durchgeführt werden. Durch die Kombination beider mutierten Bindestellen sollte auch in den Hypermutanten keine Promotoraktivität mehr messbar sein. Des Weiteren könnte ein DNA-Bandshift mit anschließendem DNase I Footprint die Bindestellen von DegU~P identifizieren beziehungsweise bestätigen. Im Rahmen dieser Promotion wurde bereits versucht die DegU und DegS Proteine mit einem Strep-Tag heterolog in *E. coli* zu produzieren und anschließend durch eine Affinitätschromatographie zu

reinigen. Die Überproduktion von DegS schlug jedoch fehl, da nicht ausreichende Mengen von DegS aufgereinigt werden konnten. Weiterhin zeigte eine Gel-Filtrations-Analyse, dass DegU unter den gegebenen Bedingungen ein Monomer bildet (Abb. 57). Es ist essentiell wichtig, dass DegU in seiner phosphorylierten Form vorliegt um die DegU~P Bindestelle zu identifizieren. Um die Phosphorylierung von DegU über DegS zu umgehen, ist es möglich Antwortregulatoren *in vitro* über Acetylphosphat zu phosphorylieren. Die *in vitro* Phosphorylierung von Regulatoren über Acetylphosphat wurde bereits für ComA aus *B. subtilis* und andere Antwortregulatoren aus *E. coli* nachgewiesen (196, 269). Auch für den Antwortregulator DegU konnte in *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain FZB42 eine Methode entwickelt werden, bei der man DegU über Acetylphosphat *in vitro* phosphorylieren kann (201).

Die bisher bestätigte Bindestelle von DegU~P im *yqiHIK* Promotorbereich lag in einem Abstand von 203 bp vor dem Transkriptionsstart (Abb. 34). Für DegU~P regulierte Gene wie *aprE* und *sacB* war ebenfalls eine Bindestelle von DegU~P mit einer großen Distanz ermittelt worden. DegU~P bindet 70 bp (288) stromaufwärts vom Transkriptionsstart vor *aprE* und im Falle von *sacB* sogar in 113 bp Entfernung (313). Vor kurzem war auch für den *flgM* Promotor eine DegU~P Bindestelle im Abstand von 80 bp zum Transkriptionsstart identifiziert worden (142). Auf Grund dieses großen Abstandes gibt es zwei Möglichkeiten wie DegU~P die Transkription dieser Zielgene fördern kann. Entweder geht DegU~P einen direkten Kontakt mit der RNA-Polymerase ein, um die Transkription zu initiieren, was eine Biegung der DegU~P Bindestelle zum Promotor hin erforderlich macht. DegU~P selber könnte auch ein DNA Beugeprotein sein und andere, weiter oben gelegene Aktivatorstrukturen in die Nähe der Polymerase bringen. Gegen weiter oben gelegene „Enhancer“ Sequenzen spricht, dass die DegU~P Bindestelle relativ am Ende der genutzten *treA* Fusion sitzt und keinen Unterschied zu einer längeren Fusion zeigt (Abb. 55). Bei transkriptionellen Aktivatoren werden zwei Klassen unterschieden. Klasse I Aktivatoren treten mit der Alpha-Untereinheit der RNA-Polymerase in Kontakt (Klasse I) und Klasse II Aktivatoren binden an die Sigma-Untereinheit der RNA-Polymerase. Ein weiterer Unterschied ist die Bindestelle der Aktivatoren. Klasse I Aktivatoren binden stromaufwärts der -35 Region des Promotors den sie regulieren. Dahingegen binden Klasse II Aktivatoren nahe an der -35 Region oder ihre Bindestelle überlappt sogar mit der -35 Region. Spo0A ist ein Transkriptionsfaktor der zur Klasse II gezählt wird. Zufällig eingeführte Mutationen mittels PCR wiesen darauf hin, dass Spo0A mit der σ^A und der σ^H Untereinheit der RNA-Polymerase interagieren kann. Durch die Einführung dieser Mutationen wurde die Transkription von Spo0A abhängigen σ^A und σ^H Promotoren verhindert (*spolIE* und *spolIG*), jedoch nicht die Promotoraktivität von Spo0A unabhängigen Genen (*gcaD*) (18). In *E. coli* wird das Phosphatregulon, welches durch Phosphathunger angeschaltet wird, durch den Transkriptionsfaktor PhoB reguliert. Dabei interagiert der Regulator PhoB mit dem σ^{70} -Faktor der RNA-Polymerase (199). Um die Hypothese, dass DegU mit der RNAP interagiert, zu bestätigen könnte ein Pull Down Experiment mit DegU~P und dem Zellextrakt durchgeführt werden.

In Darmbakterien gibt es ein Protein, NtrC, welches auch Enhancerbindeprotein genannt wird, da es an Enhancersequenzen bindet. Enhancersequenzen sind durch ihre orientierungsunabhängige transkriptionsaktivierende Funktion über eine längere Distanz charakterisiert. Dabei konnten drei Modelle definiert werden: (i) Ein regulatorisches Protein bindet an den Enhancer und wandert über die DNA bis es in der Nähe eines Promotorelements ist und dort die Bildung des Transkriptionsinitiationskomplexes fördert (219). (ii) Ein Enhancerbindeprotein verändert die DNA Struktur so, dass der Enhancer an den

Promotor bindet und so die Transkription initiiert (68). (iii) Das letzte Modell beinhaltet das DNA Looping, bei dem das Enhancer-gebundene Protein durch direkte Protein-Protein Interaktion mit der RNA-Polymerase am Promotor eine Bindung eingeht und so die Transkription stimuliert (266). Das DNA Looping kann über Mutagenesestudien der Bindestelle des Regulators mit der Polymerase identifiziert werden (200), aber auch über Elektronenmikroskopie (266), die die Interaktion des Proteins mit der RNA-Polymerase aufführt. Die Aktivierung des *glnALG* Operons in *E. coli* über NtrC erfolgt über DNA Looping. Die RNA-Polymerase bindet nur schwach an den Promotor von *glnALG* und kann dort keinen offenen Komplex bilden, der nötig für die Transkription ist. NtrC erhöht die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor (181). Dieses Szenario ist auch für die DegU~P Bindung möglich (Abb. 40). Betrachtet man die Ergebnisse der Mutagenesestudie des SigA-abhängigen Promotors fällt auf, dass die Abweichungen in der Konsensussequenz zu einer reduzierten Expression führen. Es ist also möglich, dass die Bindung der RNA-Polymerase durch diese Abweichungen in der Konsensussequenz geschwächt ist. Durch die Bindung von DegU~P wird diese Bindung verstärkt und es findet eine verbesserte Transkription statt (Abb. 40). DegU~P kann als Aktivator der RNA-Polymerase helfen an den Promotor zu binden. Dafür ist ein Beugen der DNA nötig, welches durch einen gewissen Abstand zwischen Regulator und Transkriptionsstart charakterisiert ist. Um DNA-Protein Interaktionen nachweisen zu können gibt es mittlerweile ein breites Spektrum an *in vitro* und *in vivo* Methoden (50). Dabei ist die Gelretardation, auch EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) genannt, eine populäre Methode geworden, die genutzt wird um DNA-Protein Interaktionen nachzuweisen. Die Gelretardation beruht auf einer Verschiebung des Laufverhaltens (Bandshift) der DNA durch gebundenes Protein in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel. Ein gebundenes Protein kann die Konformation der DNA verändern, sodass es zur sogenannten Beugung der DNA kommt. Diese Beugung kann die Mobilität der DNA verlangsamen. Der DNA Bandshift kann also nicht nur zur Bestätigung der putativen DegU~P Bindestelle genutzt werden, sondern auch um das Beugen der DNA nachzuweisen.

Verkürzungen der AT-reichen Region der *yqiHIK* Promotorregion deuteten darauf hin, dass diese Region kritisch für die Induktion des Operons unter hohen osmotischen Bedingungen ist. Während meiner Promotion konnte ich zeigen, dass die AT-reiche Region wichtig für die DegU~P Bindung ist und dadurch wichtig für die verstärkte Aktivierung des *yqiHIK* Promotors. Interessanterweise konnte die aktivierende Rolle des DegS-DegU TCS während der *yqiHIK* Expression durch Mutagenese des SigA-abhängigen Promotors umgangen werden. Diese Mutagenesestudie zeigte, dass Verbesserungen in der Promotorsequenz hin zum SigA-Konsensus das Expressionsniveau des *yqiHIK* Operons deutlich verstärken. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Mutagenese der -16 Region den deutlichsten Effekt hatte. Viele SigA-abhängige Promotoren beinhalten das sogenannte TG-Motiv an der Position -16 (124, 324), welches eine wichtige Rolle bei der Funktion als auch bei der Stärke des Promotors spielt. Der *yqiHIK* Promotor besitzt an der Position -16 eine GT-Basenabfolge, an Stelle des bekannten TG-Motivs. In dieser Mutante wird der Promotor im Vergleich zum Wildtyp sowohl unter physiologischen, als auch unter hyperosmotischen Bedingungen verbessert und der Salzinduktionsfaktor konnte noch weiter gesteigert werden (87). Die Deletion des DegS-DegU TCS führt bei dem Wildtyp *yqiHIK* Promotor zu einem Verlust der osmotischen Induktion. Dahingegen konnte durch den Promotor, der das mutierte TG Motiv trägt, auch in der $\Delta degSU$ Mutante noch eine Salzinduktion ermittelt werden. Neuste Experimente zu der TG-Motiv Mutante zeigen, dass diese Mutante neben der Unabhängigkeit von DegS-DegU auch

unabhängig von der AT-reichen Region das *yqiHIK* Operon osmotisch induziert ist (persönliche Kommunikation mit Bianca Warmbold). Eine Kombination der Verkürzung der AT-reichen Region mit der TG-Motiv Mutante in einem *degSU* Deletionshintergrund führte immer noch zu einer Salzinduktion des *yqiHIK* Promotors. Dies zeigt, dass die AT-reiche Region wichtig für die Bindung von DegU~P ist, aber nicht für die osmotische Induktion an sich nötig ist. Das DegS-DegU Zwei-Komponenten System ist zwar wichtig für eine verbesserte *yqiHIK* Promotoraktivität, jedoch nicht wichtig für die osmotische Induktion des *yqiHIK* Operons, wenn dieser auf einem erhöhten Niveau exprimiert wird.

Während der Analyse des *yqiHIK* Operons fiel auf, dass bezüglich der Regulation einige Parallelen zu dem *aprE* Gen existieren. Die Promotoren von *yqiHIK* und *aprE* werden durch Salzstress induziert und diese Induktion kann durch kompatible Solute aufgehoben werden (86, 180, 299). Weiterhin haben die Regulatoren DegU~P, SinR und AbrB einen Einfluss auf die Expression (86, 99, 288, 303). Beide Promotoren weisen eine erhöhte Aktivität bei Eintritt in die stationäre Phase auf (85, 86). Für *aprE* konnte weiterhin ein Einfluss des Regulators ScoC beobachtet werden (156). ScoC spielt eine entscheidende Rolle als transkriptioneller Repressor von Genen in der Übergangsphase von dem exponentiellen zu dem stationären Wachstumsabschnitt. Weiterführende Experimente könnten zeigen, ob auch der *yqiHIK* Promotor von diesem Regulator abhängt und ob es weitere Parallelen zwischen *aprE* und dem *yqiHIK* Operon gibt.

4 Die physiologische Rolle der YqiH, Yqil und YqiK Proteine

Durch die facettenreiche Regulation des *yqiHIK* Operons und der besonderen Stellung der Amidase Yqil, als stark salzinduzierbare Amidase stellt sich die Frage nach der physiologischen Rolle der Proteine, die von *yqiHIK* exprimiert werden. *yqiH* kodiert für ein putatives Lipoprotein, *yqil* für eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase (im fortlaufenden Text als Amidase bezeichnet) und *yqiK* synthetisiert eine Glycerophosphodiester Phosphodiesterase (GD-PDE). Um Hinweise zur Funktion der *yqiHIK* Genprodukte in *B. subtilis* zu erhalten, spielt der Nachweis der Lokalisation der Amidase Yqil im extrazellulären Milieu und der Glycerophosphodiester Phosphodiesterase YqiK im Gesamtzellextrakt von *B. subtilis* eine wichtige Rolle. Durch Western Blot Analysen bestätigte sich, dass die Amidase in der Tat sekretiert wird und die GD-PDE eine zytoplasmatische Glycerophosphodiester Phosphodiesterase ist (Abb. 38). Dies deutete darauf hin, dass diese Proteine an der Akquirierung von Zellbausteinen aus dem Medium beteiligt sein könnten. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass DegU~P nicht nur *yqiHIK* reguliert, sondern auch die Expression zahlreicher Exoenzyme, die daran beteiligt sind Nährstoffe aus der Umgebung abzubauen und so der Zelle als Nahrungsquelle zur Verfügung zu stellen. *B. subtilis* ist ein Kannibale, der in der Lage ist seine Geschwister, als auch andere Bakterien zu fressen um an Nährstoffe zu kommen (101, 189). Kannibalismus wird neben der Sporulation und der Biofilmbildung von dem Hauptregulator Spo0A reguliert. Interessanterweise konnte in einer Masterarbeit über die Regulation des *yqiHIK* Operons während der Sporulation gezeigt werden, dass das Operon durch den Hauptregulator Spo0A reguliert wird (327). Diese Regulationsmechanismen durch Spo0A und DegU~P suggerieren, dass die Genprodukte des *yqiHIK* Operons an dem Kannibalismusprozess beteiligt sein könnten.

In diesem Prozess könnte die Amidase YqiI die Zellwandkomponenten lysierter Zellen weiter abbauen. Zuspruch für diese Hypothese findet sich in der extrazellulären Lokalisation der Amidase YqiI. Um das freigelassene Zellmaterial aufnehmen zu können, bauen die N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase YqiI und weitere sekretierte Hydrolasen diese Bestandteile in kleinere Moleküle ab. Um die nun im extrazytoplasmatischen Bereich vorliegenden Spaltprodukte der Amidase (N-Acetylmuramyl Resten und L-Alanin) in das Zytoplasma zu transportieren, könnten diese mittels eines spezifischen Transportsystems in die Zelle einschleust werden. YqiH könnte in diesem Fall als Chaperon für YqiI fungieren und bei der Faltung der Amidase helfen, sodass dessen Sekretion vollständig abläuft. Im Zytoplasma angekommen können diese Abbauprodukte von lysierten Zellen in die Glykolyse einfließen und als Energiequelle dienen. Neben Peptidoglykanbestandteilen entstehen durch die Lyse von Zellen auch Phospholipide, welche außerhalb der Zelle durch eine extrazelluläre Phospholipase (bisher konnte in *B. subtilis* nur eine Phospholipase, YtpA, identifiziert werden) abgebaut werden und über einen Glycerophosphodiestertransporter in das Zytoplasma transportiert werden. Möglicherweise baut die zytoplasmatisch lokalisierte Glycerophosphodiester Phosphodiesterase YqiK diese akquirierten Glycerophosphodiester in Glycerol-3-Phosphat ab. Auch dieses kann in die Glykolyse einfließen und als Energiequelle dienen (Abb. 41).

In der Tat konnten diese suggerierten physiologischen Rollen für YqiH, YqiI und YqiK bereits in anderen Organismen für diese Proteinklassen nachgewiesen werden. In *Bacillus pumilus* konnte gezeigt werden, dass dieser in der Lage ist sowohl tote als auch lebende Zellen von *Arthrobacter citreus* abzubauen (35). In *B. pumilus* wird ein Lipopeptid sekretiert, welches an Zellmembranen bindet, diese durch dessen lytische Aktivität öffnet und so Zellwandbestandteile freilässt, die durch Amidasen abgebaut werden können. Eine Co-Expression von einem Lipoprotein und einer Amidase konnte häufiger beobachtet werden (147) und in *Paenibacillus* sp. W-61 konnte gezeigt werden, dass das Lipoprotein LppX als eine Art Chaperon für die extrazelluläre Xylanase Xyn1 fungiert (94). Glycerophosphodiester werden in Gram-negativen Zellen vom Periplasma in das Zytosol transportiert und dort werden sie gespalten. In *E. coli* gibt es zwei System (Ugp und Glp), die die Phospholipide spalten, die resultierenden Produkte in das Zytoplasma transportieren und sie dort weiter zu Glycerol-3-Phosphat und den entsprechenden Alkohol abbauen (45, 245). Diese können dann für die Phospholipidsynthese genutzt werden, aber auch für die Glykolyse. Der Unterschied zwischen den Systemen in *E. coli* ist unter anderem deren Lokalisation: die GD- PDE UgpQ ist ein zytoplasmatisches Enzym, während GlpQ sekretiert wird (245). Für die zytoplasmatische GD-PDE UgpQ ist es nötig, dass die Glycerophosphodiester in die Zelle transportiert werden. Hier hilft das Protein UgpB, welches Glycerophosphodiester spezifisch bindet und zu einem Membrantransporter führt. In *E. coli* bilden die Proteine UgpA, UgpE und UgpC einen ABC Transporter, der die Glycerophosphodiester transportiert (45). Durch einen Sequenzvergleich basierend auf der Aminosäuresequenz der UgpA Permease (BLAST Analyse) konnten in *B. subtilis* Homologe zu dem ABC Transport UgpA-B-E-C aus *E. coli* gefunden werden. Diese Transporter sind in *B. subtilis* für den Transport von Zuckern zuständig. Lediglich ein Operon (*yteP-R-S-T-U*) kodiert vermutlich für einen ABC Transporter, dessen Funktion aber bisher unbekannt ist.

Ein weiteres Indiz für die Beteiligung der ,durch *yqiHIK* kodierten, Proteinen an dem Kannibalismus wird durch die Tiling-Arraydaten gegeben. Kannibalismus taucht in den ersten Stunden der Sporulation auf. Die Tiling-Arraydaten zeigen, dass *yqiHIK* leicht verzögert exprimiert wird (230). Es kann also sein, dass

während der Sporulation die Zellen durch die Kannibalismusproteine (die von den *skf* und *sdp* Operons kodiert werden) kannibalisiert werden und sobald dies geschehen ist, treten YqiI und die anderen beiden Proteine in Kraft und bauen die lysierten Zellen weiter ab. Diese putativen Rollen der Proteine YqiH, YqiI und YqiK passen zu dem beobachteten Phänotyp der *yqiHIK* Deletionsmutante unter hyperosmotischen Bedingungen. Es wurde festgestellt, dass sobald das *yqiHIK* Gencluster deletiert wurde, eine Verzögerung in der Adaptationsphase stattfindet, aber dennoch derselbe Wachstumsertrag erreicht wird (87). Durch die Proteine, die von dem *yqiHIK* Operon synthetisiert werden, wird möglicherweise Energie unter Stressbedingungen oder in der Übergangsphase gewonnen, in dem sie Zellwandkomponenten lysierter Zellen weiter abbauen, die dann in die Glykolyse einfließen. Durch die Deletion fehlt diese Energiequelle und die Zelle braucht länger um sich an die Stresssituation anzupassen und einen gewissen Wachstumsertrag aufzubauen.

Ein Nachweis des Einflusses des *yqiHIK* Operons auf die Glykolyse könnte über die Ermittlung der Intermediate aus der Glykolyse erfolgen. Durch Ionenchromatographie-Massenspektrometrie und Gaschromatographie-Massenspektrometrie kann ein Vergleich zwischen dem Wildtyp und der *yqiHIK* Deletionsmutante Aufschluss über die Menge der Intermediate aus der Glykolyse geben (314). Eine weitere Methode wäre die Zufütterung markierter Zellwandbausteine oder markierter Phospholipide um nachzuweisen, ob diese in einer $\Delta yqiHIK$ Deletionsmutante noch unter Stressbedingungen in die Zelle aufgenommen und verstoffwechselt werden können.

Neben der Bereitstellung von Energiequellen könnten die Enzyme YqiK und YqiI aber auch für die Zellwandsynthese eine wichtige Rolle spielen. So können die Abbauprodukte von Phospholipiden durch YqiK wieder in die Synthese von neuen Zytoplasmamembran Komponenten einfließen. Für YqiI kann eine Beteiligung am Peptidoglykanrecycling nicht ausgeschlossen werden. YqiH und YqiK würden, wie bei ihren putativen Rolle während des Kannibalismus, auch in diesem Fall als Chaperon (YqiH) und an der Weiterverarbeitung von Phospholipiden zu Zellwandmetabolismusprodukten (YqiK) beteiligt sein. Im Gegensatz dazu würde YqiI nun aus noch lebenden Zellen Zellwandmaterial abbauen. In *E. coli* wurde der N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase AmpD eine Rolle während des Peptidoglykanrecyclings zugeordnet (149). AmpD ist eine zytoplasmatische Amidase und spaltet anHMurNAc-Peptid Verbindungen und lässt dadurch die Peptide frei. Diese können dann recycelt werden. Der Recyclingweg in *B. subtilis* wurde vor kurzem entdeckt und zeigt, dass die wieder aufgenommenen Zellwandbausteine wieder als Vorläufermoleküle für Zellwandmaterial genutzt werden können. Die Schlüsselenzyme stellen in diesem Prozess die Proteine NagZ (YbbD) sowie AmiE (YbbE) dar. NagZ, eine N-Acetylglucosaminidase wird ins Medium sekretiert. Dabei findet eine nichtkovalente Bindung des NagZ Proteins an die freigesetzten Peptidoglykanketten statt. Nach einer Prozessierung von Seiten dieses Proteins findet anschließend eine weitere Hydrolyse durch die extrazelluläre Amidase AmiE statt. AmiE ist eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase mit einer β -Lactamase Domäne und einem Signalpeptid und hat keine Amidase_2 oder Amidase_3 Domäne (190). Durch die N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase Funktion von YqiI stellt sich die Frage, ob es das AmiE Protein während des Zellwandrecyclings ersetzen oder unterstützen kann. Das verzögerte Wachstum der *yqiHIK* Deletionsmutante könnte auch mit dem Peptidoglykanrecycling zusammenhängen (87). Während des Wachstums von *B. subtilis* werden über 50% des Peptidoglykans in einer Generation freigesetzt (267). Sollte das Recycling dieses Peptidoglykans nicht vollständig funktionieren, würde dies einen massiven Verlust an Ressourcen und

Energie für die Zelle bedeuten. Dadurch würde die Zelle langsamer wachsen, da sie selber viel mehr Zellwandbausteine neu synthetisieren muss, anstelle die alten Materialien zu recyceln. Um den Einfluss der Amidase YqiI auf das Recycling nachzuweisen, wäre es interessant, den Zellwand-Turnover zu bestimmen. In diesem Fall mit einer *yqiI* Deletionsmutante sowie einer Doppelmutante von *amiE* und *yqiI*, um einen Effekt auf das Peptidoglykanrecycling zu detektieren.

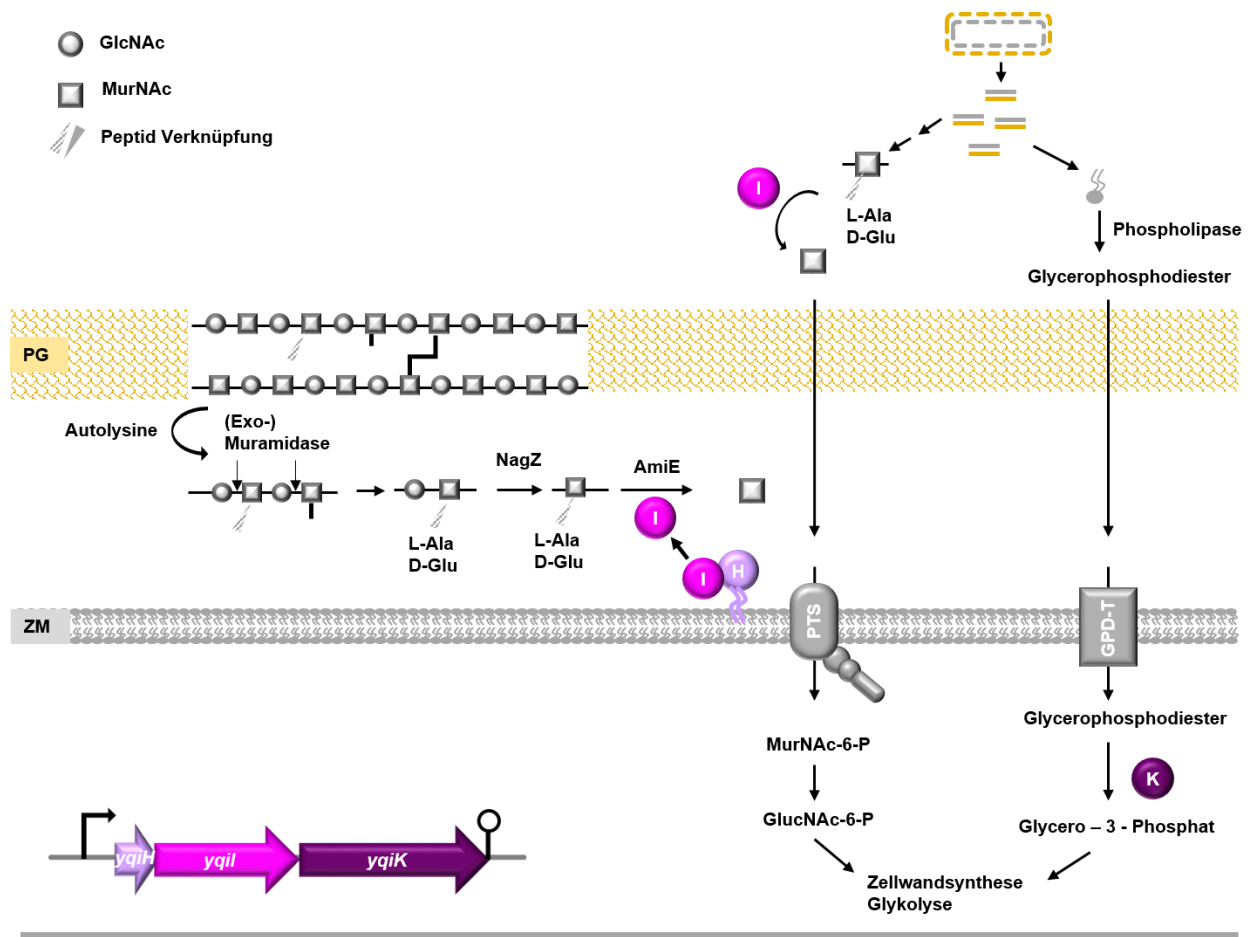


Abb. 41: Model zur physiologischen Rolle der YqiH, YqiI und YqiK Proteine

Dargestellt sind die putativen Rollen von YqiH, YqiI und YqiK während des Zellwandrecyclings (linker Teil der Abbildung) und des Kannibalismus (rechter Teil der Abbildung). Der Raum zwischen der Zytoplasmamembran und dem Peptidoglykan ist *in vivo* viel schmäler, wurde aber zur Vereinfachung des Modells vergrößert. Eine detaillierte Beschreibung findet sich im Text. PTS steht für Phosphotransferasesystem und GPD-T für Glycerophosphodiester Transporter. Der pinke Kreis mit I steht für die Amidase YqiI, der lila Kreis mit H für das Lipoprotein YqiH und der dunkel violette Kreis mit K für die Glycerophosphodiester Phosphodiesterase YqiK. Peptidoglykan ist mit PG und die Zytoplasmamembran mit ZM abgekürzt.

5 Wahrnehmung eines Umweltreizes in *B. subtilis*

5.1 DegS ist nicht der global-agierende Osmosensor in *B. subtilis*

Die Wahrnehmung eines Stresssignals, wie zum Beispiel erhöhte Salzkonzentrationen, und die Weiterleitung dieses Reizes können über verschiedene Systeme erfolgen. Ein sogenannter Osmosensor ist ein Instrument, um zum Beispiel Veränderungen in der extrazellulären Wassermenge wahrzunehmen, diese Wahrnehmung wird als direkte Osmowahrnehmung betitelt. Es gibt aber auch eine indirekte

Osmowahrnehmung welche über Veränderungen in der Zellstruktur erfolgt. In *E. coli* konnten verschiedene putative Osmosensoren identifiziert werden. Unter anderem wurden der Transporter ProP und der MscL Kanal in *E. coli* als putative Osmosensoren identifiziert, die *in vitro* ein osmotisches Signal wahrnehmen können. In den meisten Fällen findet die Wahrnehmung von Umweltreizen aber über die Sensorkinase von Zwei-Komponenten Systemen statt. Dabei nimmt die Sensorkinase den Reiz auf und wandelt ihn in ein chemisches Signal um, welches den Antwortregulator stimuliert und so eine spezifische Antwort fördert (83). In *B. subtilis* konnten 36 Sensorkinasen und 34 Antwortregulatoren identifiziert werden, davon werden 30 der Kinase-Regulator Paare in einem Operon kodiert (83). In vorangegangenen Studien wurde die Rolle von DegS, der Sensorkinase des DegS-DegU TCS, als Osmosensor immer wieder diskutiert (180, 278, 279). Das TCS System an sich ist selber Salzstress-induziert, aber auch Gene (*sacB*, *aprE*), die das TCS reguliert, wie auch Proteine (DegQ), die ihrerseits DegS-DegU regulieren, weisen eine Induktion durch Salzstress auf. Unter Salzstressbedingungen verändert sich die Ionenkomposition im Zytoplasma, sodass es denkbar ist, dass die zytoplasmatisch lokalisierte Sensorkinase DegS diese Veränderungen wahrnimmt und den Antwortregulator daraufhin phosphoryliert um eine transkriptionelle Antwort hervorzurufen. Von den 36 bekannten Sensorkinasen in *B. subtilis* werden nur zwei weitere Kinasen im Zytoplasma lokalisiert. KinA spielt eine wichtige Rolle in dem Phosphorelay zu Phosphorylierung des Hauptregulators Spo0A (184) und YhcY wird durch das LiaR Regulon kontrolliert, weitere Rollen dieses TCS sind aber nicht bekannt. Um die Rolle von DegS als Salzsensoren genauer zu analysieren, wurden während dieser Arbeit verschiedene Experimente durchgeführt. Das erste Experiment betraf die physiologische Rolle des DegS-DegU TCS unter hyperosmotischen Bedingungen. Hierbei erwies sich, dass die Deletion des TCS nur einen sehr geringen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *B. subtilis* bei Salzstress hat (Abb. 16). Interessanterweise wiesen die Hypermutanten [*degU32(Hy)* und *degS200(Hy)*] einen Phänotyp auf, der zu einem stark verbesserten Wachstum von *B. subtilis* sowohl unter isotonischen sowie unter hyperosmotischen Bedingungen führte. Dieses Ergebnis signalisierte, dass das DegS-DegU TCS nicht essentiell für das Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen ist, wie es für andere osmosensorische Systeme bereits beobachtet worden war (46, 209).

Der zweite Schritt erfolgte über die Analyse des DegU~P Regulons (197) in Hinsicht auf dessen osmotische Induktion. Wäre DegS der Salzsensoren würde man davon ausgehen, dass das DegS-DegU TCS Gene reguliert, die an der Adaptation an Salzstress beteiligt sind und deren Salzinduktion von dem DegS-DegU TCS abhängt. Die Analyse zahlreicher Gene aus dem DegU~P Regulon zeigte verschiedene Expressionsmuster. Die Reportgenanalysen zeigten, dass DegU~P einen Einfluss auf die Salzinduktion verschiedener Gene aus dem DegU~P Regulon hat, jedoch das DegS-DegU TCS nicht nötig ist um diese Salzinduktion wahrzunehmen (Abb. 20). Zusätzlich hat die Deletion des DegS-DegU TCS keinen Einfluss auf die wichtigen osmotisch induzierbaren Gene der Prolinsynthese (*proHJ*) und des Glycin-Betain Aufnahmesystems OpuA (*opuAA-opuAB-opuAC*) (41, 134). Der Einfluss von Zwei-Komponenten Systemen auf Gene, deren Genprodukte an der Osmoadaptation beteiligt sind konnte bereits in *E. coli* gezeigt werden (263, 342). Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass DegS kein essentieller Osmosensor ist.

Ein weiterer Nachweis, dass DegS nicht der global-agierende Osmosensor ist, wurde unter Zuhilfenahme des *yqiHIK* Operons dargelegt. Durch die DegS-DegU abhängige Regulation des stark osmotisch

induzierbaren *yqiHIK* Operons existiert ein experimentell gut zugängliches System, um die Frage nach der Signalwahrnehmung in *B. subtilis* unter hyperosmotischem Stress zu studieren. Hierbei spielt der SigA-abhängige Promotor von *yqiHIK* eine wichtige Rolle, da dieser Abweichungen in der Konsensussequenz zum SigA-abhängigen Promotor aufweist. Durch Mutagenesestudien wurde gezeigt, dass diese Abweichungen des SigA-abhängigen *yqiHIK* Promotors im Vergleich zu der Konsensussequenz SigA-abhängiger Promotoren dazu führen, dass der *yqiHIK* Promotor unter physiologischen Bedingungen auf einem geringen Niveau exprimiert wird. Aber auch unter hyperosmotischen Bedingungen findet eine erhöhte Expression des *yqiHIK* Promotors durch die eingeführten Mutationen im SigA-abhängigen Promotor statt (87). Dieses Expressionsmuster von SigA-abhängigen und salzinduzierten Promotoren konnte auch schon bei den Promotoren von *opuA*, *opuE* und *proH* festgestellt werden (41, 134, 296). Durch die Mutagenese des SigA-Promotors hin zur Konsensussequenz konnte die Expression des *yqiHIK* Promotors angehoben werden, sodass in dem *degSU* Deletionsstamm immer noch eine Salzinduktion detektierbar war. Die *degSU* Deletionsmutante in Kombination mit dem mutierten TG Motiv (-16 Region) wies dabei eine Salzinduktion um den Faktor 4 auf (Tabelle 6). Auch die anderen Mutanten wiesen noch eine zweifache Salzinduktion auf. Durch die SigA-Promotor Mutanten wurde also der Bedarf der Aktivierung durch das DegS-DegU TCS umgangen und es konnte eine Expression und Salzinduktion festgestellt werden. Auch durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die Zelle trotz der Deletion des DegS-DegU TCS ein osmotisches Signal wahrnimmt und eine spezifische Antwort auslöst.

Ein letztes Experiment wurde auch unter Zuhilfenahme des *yqiHIK* Operons durchgeführt. In diesem Versuch, lag die Sensorkinase DegS durch ein sogenanntes „domain swapping“ nun in der Membran verankert vor. Dies erfolgte durch den Austausch der Sensordomäne von DegS mit der Sensordomäne und den Transmembrandomänen von KinC. KinC ist eine Sensorkinase aus dem Phosphorelaysystem zur Phosphorylierung von Spo0A und reagiert wie KinA und KinB nicht auf osmotischen Stress (272). Es stellte sich heraus, dass das *yqiHIK* Operon salzinduzierbar blieb, aber unter hyperosmotischen Bedingungen um circa die Hälfte niedriger exprimiert wurde, verglichen mit einem Stamm der das Wildtyp DegS exprimiert (Abb. 36). KinC ist eine Kinase, die Kaliumausstrom aus der Zelle wahrnimmt, welcher zum Beispiel durch Lipopeptide wie Surfactin hervorgerufen werden kann. Unter den getesteten Bedingungen wurde kein Surfactin zugefügt, sodass vermutlich kein starker Kaliumausstrom aus der Zelle stattfand, auf den das Chimärenzym KinC-DegS reagieren hätte können. Durch dieses Experiment konnte weiter bewiesen werden, dass DegS nicht der Salzsensormotor ist. Es wurde aber auch erwiesen, dass keine volle Expression unter hyperosmotischen Bedingungen stattfindet, wenn DegU nicht mehr durch die Sensorkinase phosphoryliert wird.

Zusammenfassend zeigten alle vier Experimente, dass die Zelle auch ohne die Sensorkinase DegS ein osmotisches Signal wahrnehmen konnte und so eine spezifische Antwort auf diesen Stress hervorrief. Eine Rolle des TCS bei der Adaptation an Salzstress konnte aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, da DegU~P unter hyperosmotischen Bedingungen einen Einfluss auf salzstressinduzierte Gene hatte, sowie eine Deletion des DegS-DegU Zwei-Komponenten Systems zu einer leicht verlängerten Lag-Phase unter hyperosmotischen Bedingungen führt.

Das DegS-DegU Zwei-Komponenten System ist in *B. subtilis* zwar kein essentielles Osmoregulationssystem, es ist aber dennoch wichtig als Aktivator für einige salzregulierte Gene, wie am Beispiel von *yqiHIK* detailliert gezeigt wurde. Durch die geplanten Microarray Analysen wird die Gelegenheit gegeben, die aus der *yqiHIK* Analyse gewonnen Erkenntnisse auf den salzabhängigen Teil des DegU oder DegU~P Regulons zu übertragen.

5.2 Welches Signal nimmt DegS wahr?

Da DegS als essentielle Sensorkinase ausgeschlossen werden könnte, stellt sich weiterhin die Frage welches Signal die Sensorkinase DegS wahrnimmt. Interessanterweise konnten für das DegS-DegU TCS in *B. subtilis* verschiedene Stimuli identifiziert werden, die die Expression des DegS-DegU TCS an sich und von DegS-DegU regulierten Genen beeinflussen (Abb. 42). Für das DegS-DegU TCS konnten die Stickstofflimitation, die Inhibition der Flagellenrotation, sowie Methylsalicylat als Signale identifiziert werden, die das Zwei-Komponenten System aktivieren (52, 169, 341). Indirekt konnte auch Glukose als Signal identifiziert werden (146, 290). Durch die Regulation der Expression des *degU_{P3}* Promotors durch SinR (242) besteht auch die Möglichkeit, dass Biofilm-induzierende Bedingungen einen Einfluss auf die Sensorkinase DegS haben. Während meiner Promotion konnte ich zeigen, dass Salzstress die Promotoraktivität von *degS* und *degU_{P3}* induziert, aber auch zur Phosphorylierung der Sensorkinase DegS führt (Abb. 12) (rote Pfeile). Dies liegt begründet in dem positiven Feedback Loop von DegU~P auf seinen eigenen Promotor (*degU_{P3}*), welcher durch Salzstress weiter verstärkt wird. Für den positiven Feedback Loop muss DegU durch DegS phosphoryliert werden, dem entsprechend wird DegS durch hyperosmotischen Stress phosphoryliert um den positiven Einfluss von DegU~P auf *degU_{P3}* unter diesen Salzstressbedingungen zu fördern.

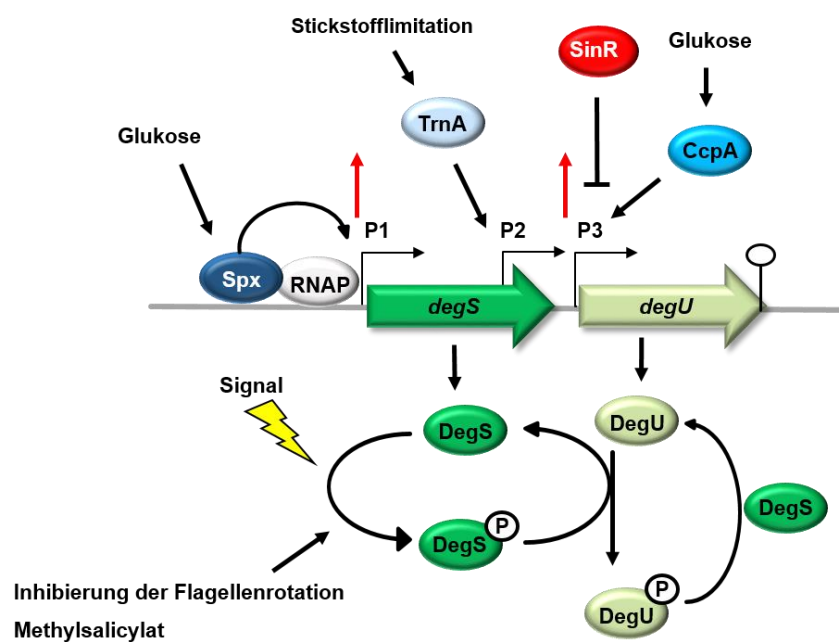


Abb. 42: Signale die das DegS-DegU TCS aktivieren

Gezeigt sind die Signale, die das DegS-DegU TCS aktivieren. Rote Pfeile bei den Promotoren stehen für eine Salzinduktion. Striche mit einem Kreis als Abschluss zeigen Terminatoren an, wohingegen gebogene Pfeile einen Promotor darstellen.

Neben dem Einfluss des Salzstresses führt die Inhibition der Flagellenrotation zu einer Aktivierung von Genen, die von DegU reguliert werden (52). Damit zusammenhängend konnten in den Transkriptomdaten salzgestresster Zellen, die Gene für die Flagellenbildung als reprimiert identifiziert werden. Die Prozesse in die DegS-DegU involviert ist, sprich die Expression von Exoproteasen in der Übergangsphase zur stationären Phase und während der Biofilmbildung sind alles Prozesse in denen begeißelte Zellen einen negativen Einfluss hätten. Durch Sekretion von Exoproteasen werden Nährstoffe freigesetzt, die die Zelle aufnehmen kann. Schwimmt sie jedoch durch ihre Flagellen von der Nahrung weg, hat die Sekretion von Exoproteasen keinen Vorteil für die Zelle. In einem Biofilm verbinden sich die Zellen untereinander und mit der Oberfläche auf der sie sich befinden. Dadurch ist auch eine Ausbildung von Flagellen nicht nötig. Die Deletion des Flagellenstators (MotB, in Verbindung mit MotA wird der Motor des Flagellums gebildet) führt zu einer erhöhten DegU~P Konzentration (52). Neben seiner Aktivierung durch die Inhibition der Flagellenrotation führt DegU~P selbst zu einer Verhinderung der Flagellenbiosynthese, indem es das *fla/che* Operon inhibiert (313). Dieses Operon kodiert für Proteine, die an dem Aufbau des Flagellums und an der Chemotaxis in *B. subtilis* beteiligt sind. Durch die Repression des *fla/che* Operons durch Salz, aber auch durch DegU~P, welches unter Salzstress stark exprimiert wird, wird die Flagellenbildung inhibiert und dies würde auch zu einem Fehlen der Flagellenrotation führen. Des Weiteren aktiviert DegU~P die Expression von *flgM*, welches für einen Anti-Sigmafaktor kodiert (142). FlgM inhibiert die Bindung des σ^D Sigmafaktors an die RNA-Polymerase, sodass das *fla/che* Operon, welches unter anderem einen σ^D abhängigen Promotor hat nicht exprimiert wird.

Es bestehen nun zwei Möglichkeiten wie DegS die Inhibition der Flagellenbewegung wahrnimmt und so DegU phosphorylieren kann. DegS könnte mit Komponenten des Flagellenmotors interagieren. Vorher ist, durch die Bewegung des Flagellenmotors, eine Interaktion nicht möglich. Man kann sich aber auch vorstellen, dass die Inhibition des Flagellenrotors zu einer Veränderung der Ionenkonzentration führt, da das Flagellum durch die sogenannte Proton-Motiv-Force angetrieben wird. Durch Salzstress verändert sich die Zellwand von *B. subtilis*, indem sie dicker wird [T.Hoffmann und E.Bremer unveröffentlichte Daten (191, 192)]. Dadurch verändert sich das Zytoplasmavolumen und die damit verbundenen Ionenkonzentrationen. Da das DegS-DegU TCS durch Salzstress induziert wird, besteht also die Möglichkeit, dass die Inhibition der Flagellenrotation und der Salzstress die Ionenkonzentration auf die gleiche Weise verändern und dies ein Signal für die DegS Sensor kinase darstellt. Ein weiterer Zuspruch für die Hypothese, dass die Inhibition der Flagellenrotation zu einer Autophosphorylierung von DegS führt, verläuft über den Effekt von Methylsalicylate auf das DegS-DegU TCS. Methylsalicylate kann durch Pflanzen produziert werden und regt *B. subtilis* in einer DegS-DegU abhängigen Weise dazu an Poly- γ -glutamat zu synthetisieren (169). Dem entsprechend ist es möglich, dass Methylsalicylat zur Autophosphorylierung von DegS führt. Interessanterweise konnte für Methylsalicylat in *E. coli* ein Einfluss auf das Chemotaxissystem festgestellt werden (243). Durch Methylsalicylat fängt *E. coli* an länger zu Taumeln, wie er es auch als Antwort auf ein Repellent macht. Es besteht also die Möglichkeit, dass Methylsalicylat auch einen Einfluss auf das Flagellum von *B. subtilis* hat und so indirekt die Autophosphorylierung von DegS fördert, indem es die Flagellenrotation inhibieren könnte. Ein Experiment, welches die Hypothese stützen könnte, wäre die Zugabe von Methylsalicylat in Schwimm-

Agar Platten um zu sehen, ob durch die Zugabe von Methylsalicylat das Schwimmverhalten von *B. subtilis* beeinflusst wird.

5.3 Wie kann *B. subtilis* den Salzstress wahrnehmen?

Bisher konnte noch kein osmosensorisches, regulatorisches System in *B. subtilis* identifiziert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass dieses System essentiell ist, wodurch ein Screeningverfahren für dieses System nicht möglich ist. Weiterhin ist es möglich, dass so ein System gar nicht existiert. Gegen diese letzte Hypothese spricht, dass bei der Analyse von Expressionsmustern diverser salzinduzierbarer Gene in *B. subtilis* ein feinabgestimmtes Expressionsprofil in Bezug auf die externe Osmolarität nachgewiesen worden war. Dabei zeigen die Gene *proHJ* und *opuE* eine osmotische Induktion, die sich proportional zur ansteigenden NaCl-Konzentration verhält. Das *proHJ* Gencluster kodiert für Proteine die für die Synthese des kompatiblen Soluts Prolin zuständig sind (41) und *opuE* kodiert für ein osmotisch-induzierbares Prolinaufnahmesystem (323). In *B. subtilis* konnte bisher aber kein Signal identifiziert werden, welches die Expression zahlreicher osmotisch induzierbarer Gene reguliert (299). Dabei ist auch noch nicht klar, ob die Zelle Veränderungen in der externen Osmolarität wahrnimmt oder abgeleitete Veränderungen innerhalb der Zelle. Hyperosmotische Bedingungen können zu verschiedene Veränderungen in der Zelle führen. Dabei können Sensorkinasen unterschiedliche Stimuli wahrnehmen, je nachdem wo sie lokalisieren. Eine membrangebundene Sensorkinase ist nicht nur in der Lage extrazelluläre Signale wahrzunehmen, sondern auch Veränderungen in der Zytoplasmamembran, wie zum Beispiel einen osmotischen Gradienten über die Membran, Veränderungen im Druck oder der Dicke der Zellmembran. Im Gegensatz dazu wird eine zytoplasmatisch lokalisierte Sensorkinase Veränderung im Turgor, der zytoplasmatischen Osmolarität oder der Ionenkonzentration wahrnehmen. Ein wichtiges Kriterium, welches das Signal für die Osmoantwort besitzen sollte, ist dessen schnelles Vorhandensein nach einem hyperosmotischen Stress. Weiterhin sollte dieses Signal auch spezifisch für den Stress sein.

Durch die Analyse des DegS-DegU TCS konnte zwar gezeigt werden, dass DegS nicht der essentielle Salzsensoren in *B. subtilis* ist, dennoch wird auf Grund der vorhandenen Daten vermutet, dass DegS in Antwort auf osmotischen Stress phosphoryliert wird (Abb. 14). Dies bedeutet, dass ein intrazelluläres Signal vorhanden sein müsste, welches DegS zur Autophosphorylierung anregt. Ein weiterer Hinweis für ein intrazelluläres Signal in *B. subtilis* konnte auch durch das SigB-Regulon gegeben werden. Der allgemeine Stresssensor SigB reagiert auf verschiedenste Stresse wie Hitzeschock, Ethanolstress und Salzstress, wobei osmotischer Stress vor kurzem als stärkster Induktor für dessen Regulon identifiziert wurde (119, 228). Das SigB-Regulon umfasst ca. 200 Gene und somit 5 % des gesamten Genoms von *B. subtilis*. Deletiert man das *sigB* Gen, zeigt die Zelle jedoch keinen signifikanten salzsensitiven Phänotyp unter kontinuierlichen Stressbedingungen (119). Die Gene die durch SigB reguliert werden, werden nur transient auf einen hyperosmotischen Up-Schock induziert (343). Dabei zeigte sich auch, dass die Deletion von *sigB* nach einem hochosmolaren Salzschock zu einem salzsensitiven Phänotyp führte. Ein besonderes Ziel von SigB ist das sogenannte Stressosom, welches eine wichtige Rolle bei der Stressadaptation spielt. Dieses System besteht aus drei Proteinen (RsbR, RsbS und RsbT) und besitzt keine Membrankomponente, sondern ist zytoplasmatisch lokalisiert (203). In diesem Proteinkomplex werden Signale aus der Umwelt als Stressfaktoren wahrgenommen und letztendlich als ein Einzelsignal

weitergegeben (203, 252). Neben der zytoplasmatischen Sensorkinase DegS wird auch das Stressosom durch Salzstress induziert, jedoch ist in beiden Fällen der genaue Mechanismus nicht bekannt. Jedoch lässt das Fehlen einer Membrankomponente bei beiden Systemen vermuten, dass die zytoplasmatischen Systeme Veränderungen in der externen Osmolarität indirekt über Veränderungen im Zytoplasma wahrnehmen. Nicht nur in *B. subtilis* gibt es Beispiele für die Existenz eines intrazellulären Signals, sondern auch in *E. coli*. Das TCS EnvZ/OmpR besitzt zwar eine membrangebundene Sensorkinase (EnvZ), jedoch konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Sensorkinase die Konformation des zytoplasmatischen Teils in Antwort auf osmotischen Stress verändert (326). Dadurch wird postuliert, dass EnvZ ein zytoplasmatisches Signal wahrnimmt. (82, 263).

Im Gegensatz dazu postulierte Rubinstein *et al.*, dass KinD ein Osmosensor ist, dessen Kinaseaktivität durch osmotischen Stress ansteigt und dessen Phosphataseaktivität abnimmt (272). Dies führt zu einer Erhöhung der Spo0A~P Konzentration, die wiederum die Expression der Matrixgene reprimiert. KinD ist neben KinB und KinC in der Membran verankert, lediglich KinA weist eine zytoplasmatische Lokalisation auf. KinA reagiert aber im Gegensatz zu KinD nicht auf osmotischen Stress. Auch wenn KinD, das Stressosom und DegS in Verbindung mit der Salzstressantwort stehen ist bisher unklar, ob und wie *B. subtilis* diese Proteine nutzt um Veränderungen in der externen Salzkonzentration zu messen.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass *B. subtilis* ein intrazelluläres Signal wahrnimmt, welches von der externen Osmolarität abgeleitet wird. Hohe Osmolaritäten verändern die Ionenzusammensetzung und die biophysikalischen Eigenschaften des Zytoplasmas (58, 331, 337). Dabei spielt die intrazelluläre Akkumulation von Kalium, als eine der ersten Antworten auf hyperosmotischen Stress, eine entscheidende Rolle (164). Es besteht also die Möglichkeit, dass die Kaliumionen zu der adaptiven Antwort von *B. subtilis* führen. So konnte gezeigt werden, dass nach einem osmotischen Up-Shock sich die Kaliumkonzentration innerhalb einer Stunde fast verdoppelt (332). In *Corynebacterium glutamicum* wird der Osmosensor BetP durch erhöhte intrazelluläre Kaliumkonzentrationen aktiviert, welcher mit einer verbesserten Aufnahme von Glycin-Betain reagiert und so die Osmoadaptation unterstützt (271). Geht man von einem intrazellulären Salzstresssignal aus, welches von einem Osmosensor wahrgenommen wird, existiert in *B. subtilis* noch ein weiteres TCS, das TCS YhcZ-YhcY, dessen Sensorkinase YhcY zytoplasmatisch lokalisiert. Detaillierte genetische und physiologische Analysen könnten die Rolle dieser Sensorkinase in Bezug auf die Osmoadaptation aufführen.

Neben der Möglichkeit eines Osmosensors und damit verbunden den Kaliumionen als Osmosignal könnten diese Ionen aber auch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA beeinflussen. In diesem Zusammenhang wurde die Veränderungen der DNA Topologie diskutiert. Unter hyperosmotischen Bedingungen verändert sich das DNA-Supercoiling, sodass eventuell osmoregulierte Promotoren ihre Transkriptionsaktivität verändern, indem die RNA-Polymerase nicht mehr an die veränderte DNA binden kann oder verstärkt daran binden kann (130, 174). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA durch hohe Kaliumkonzentrationen beeinflusst wird. Diese Veränderung der Bindung führt zu einer transienten Veränderung des Transkriptionsprofils verschiedener Zielgene (49).

VI Material und Methoden

1 Chemikalien und Materialien

Alle Chemikalien wurden von nachfolgenden Firmen (falls nicht ausdrücklich erwähnt) bezogen: AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und QIAGEN (Hilden, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Germany), GE Healthcare (München, Germany).

1.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Alle Stämme die in dieser Arbeit verwendet wurden sind in Tabelle 8, Tabelle 9 und Tabelle 10 aufgeführt. Bei den angegebenen *E. coli* Stämmen handelt es sich um ein *E. coli* K-12 Derivat (DH5α). Dahingegen handelt es sich, bei denen in Tabelle 9 und Tabelle 10 aufgeführten *B. subtilis* Stämmen um Derivate des Wildtyp-Stammes 168 (Wildtyp 168) (20). Die Bezeichnung der Gene folgt der von B. Bachmann vorgeschlagenen Nomenklatur (15).

In Tabelle 11 werden alle verwendeten beziehungsweise im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide dargestellt.

Die Auflistung der Oligonukleotide ist in Tabelle 12 zu finden.

1.2 Bakterienstämme

Tabelle 8: *E. coli* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5α	F-λ- <i>E44</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 Φ80d/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> hsdR17(rK- mK +) <i>recA1 endA thi-1 relA1 gyrA96</i>	(112)
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), 80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 deoR araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL strR endA1 nupG</i>	Invitrogen (Darmstadt)
XL 10- Gold	<i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> The Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 Tetr F'[<i>proAB lacI q</i> ZΔ <i>M15</i> Tn10(Tetr) Amy Camr]	Agilent Technologies (La Jolla, USA)
NEB5α	<i>fhuA2</i> Δ(<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ80 Δ(<i>lacZ</i>) <i>M15</i> <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	NEB
BL21-pOFX	F ⁻ <i>gal met r^m hsdS</i> (Δ <i>D3</i>) mit dem Plasmid pOFXtac_SL2 (CmI ^R , <i>E.coli</i> Vektor, Expression von <i>groES</i> and <i>groEL</i> unter der Kontrolle des pTac Promotor)	Stratagene Amsterdam und (57)

Tabelle 9: *B. subtilis* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
Wildtyp168	<i>trpC2</i>	(20)
JGB34	Δ(<i>treA::ery</i>)	Jutta Gade, AG Bremer
MD282	Δ(<i>degSU::neo</i>)	M. Dahl; Universität Konstanz
MD300	<i>degU32</i> (Hy), <i>aphA3</i>	(197)
PB5390	<i>degS200</i> (Hy), <i>spc</i>	(218)
sinR	Δ(<i>sinR::spc</i>)	O. Kuipers, Universität Groningen
sinI	Δ(<i>sinI::spc</i>)	O. Kuipers, Universität Groningen
DS2679	<i>remA::TnYLB kan</i>	Daniel Kearns, Bloomington

FSB5	$\Delta(\text{sigBD2}::\text{spc})$	(296)
TMB5	$\Delta(\text{proHJ}::\text{tet})$	(133)
DL474	$\Delta(\text{degS}::\text{tet})$ (<i>amyE::kinC-degS</i> , spc)	(193)
DL447	$\Delta(\text{degS}::\text{tet})$	(193)

Tabelle 10: Während dieser Arbeit konstruierte Stämme

Stamm	Genotyp	Konstruktion ^a
SLB4	$\Delta(\text{rapG-phrG}::\text{tet})$	168 + PCR $\Delta(\text{rapG-phrG}::\text{tet})$
SLB5	$\Delta(\text{phrG}::\text{tet})$	168 + PCR $\Delta(\text{phrG}::\text{tet})$
SLB6	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})1$ $\Delta(\text{rapG-phrG}::\text{tet})$	KFB41 + gDNA SLB4
SLB8	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})1$ $\Delta(\text{phrG}::\text{tet})$	KFB41 + gDNA SLB5
SLB19	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut2}$	KFB25 + gDNA JGB34
SLB20	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut6}$	KFB34 + gDNA JGB34
SLB21	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut7}$	KFB35+ gDNA JGB34
SLB26	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut2}$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB19 + gDNA MD282
SLB27	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut6}$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB20 + gDNA MD282
SLB28	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut7}$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB21 + gDNA MD282
SLB30	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})$	KFB15 + gDNA JGB34
SLB31	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut1}$	KFB24 + gDNA JGB34
SLB32	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut3}$	KFB26 + gDNA JGB34
SLB33	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut4}$	KFB32 + gDNA JGB34
SLB34	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut5}$	KFB33 + gDNA JGB34
SLB35	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB30 + gDNA MD282
SLB36	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB31 + gDNA MD282
SLB37	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut3}$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB32 + gDNA MD282
SLB38	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut4}$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB33 + gDNA MD282
SLB39	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut5}$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB34 + gDNA MD282
SLB40	168 Wildtyp $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	168 + gDNA MD282
SLB41	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB30 + gDNA MD300
SLB42	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut1}$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB31 + gDNA MD300
SLB43	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut2}$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB19 + gDNA MD300
SLB44	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut3}$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB32 + gDNA MD300
SLB45	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut4}$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB33 + gDNA MD300
SLB46	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut5}$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB34 + gDNA MD300
SLB47	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut6}$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB20+ gDNA MD300
SLB48	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}'\text{-treA,cat})\text{mut7}$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB21 + gDNA MD300
SLB49	[<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	168 + gDNA MD300
SLB54	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}_{279\text{bp}}'\text{-treA,cat})$	KFB55 + gDNA JGB34
SLB55	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}_{270\text{bp}}'\text{-treA,cat})$	KFB56 + gDNA JGB34
SLB56	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}_{250\text{bp}}'\text{-treA,cat})$	KFB57 + gDNA JGB34
SLB57	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}_{279\text{bp}}'\text{-treA,cat})$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB54 + MD300
SLB58	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}_{270\text{bp}}'\text{-treA,cat})$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB55 + MD300
SLB59	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}_{250\text{bp}}'\text{-treA,cat})$ [<i>degU32(Hy),aphA3</i>]	SLB56 + MD300
SLB60	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}_{279\text{bp}}'\text{-treA,cat})$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB54 + MD282
SLB61	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}_{270\text{bp}}'\text{-treA,cat})$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB55 + MD282
SLB62	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}_{250\text{bp}}'\text{-treA,cat})$ $\Delta(\text{degSU}::\text{neo})$	SLB56 + MD282
SLB63	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$	168 + gDNA KFB41
SLB75	$\Delta(\text{treA}::\text{ery})1$ <i>amyE::</i> $\phi(\text{yqiH}\text{-treA,cat})21$	SLB63 + lin. pSL25

SLB76	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)22$	SLB63 + lin. pSL26
SLB83	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)21$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB75 + gDNA MD300
SLB84	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)22$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB76 + gDNA MD300
SLB99	$\Delta(proHJ::tet)$ [degU32(Hy),aphA3]	TMB105 + MD300
SLB101	yqiH:: $\phi(yqiH-FLAG-Tag)$	168 + pSL3
SLB103	yqil:: $\phi(yqil-FLAG-Tag)$	168 + pSL7
SLB105	yqiK:: $\phi(yqiK-FLAG-Tag)$	168 + pSL11
SLB107	aprE:: $\phi(aprE-FLAG-Tag)$	168 + pSL15
SLB109	$\Delta(degS::tet)$	168 + gDNA DL447
SLB110	yqiH:: $\phi(yqiH-FLAG-Tag)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB101 + gDNA MD300
SLB112	yqil:: $\phi(yqil-FLAG-Tag)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB103 + gDNA MD300
SLB114	yqiK:: $\phi(yqiK-FLAG-Tag)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB105 + gDNA MD300
SLB116	aprE:: $\phi(aprE-FLAG-Tag)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB107 + gDNA MD300
SLB125	$\Delta(degS::tet)$ amyE::(degS-kinC::spc)	SLB109 + gDNA DL447
SLB129	$\Delta(degS::tet)$ amyE::(degS-kinC,spc) $\Delta(treA::ery)1$	SLB125 + gDNA KFB41
SLB130	degS::tet amyE::(degS-kinC,spc) $\Delta(treA::ery)1$ yqiH:: $\phi(yqiH-treA,cat)$	SLB129 + gDNA KFB41
SLB131	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(phrG-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL1
SLB132	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(rapG-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL2
SLB133	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(phrG-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB131 + gDNA MD282
SLB134	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(phrG-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB131 + gDNA MD300
SLB135	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(rapG-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB132 + gDNA MD282
SLB136	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(rapG-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB132 + gDNA MD300
SLB144	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)27$	SLB63 + lin. pSL29
SLB152	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)26$	SLB63 + lin. pSL27
SLB154	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ywqH'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL36
SLB155	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yukE'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL32
SLB156	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yfjA'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL34
SLB157	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(mpr'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL33
SLB158	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yjhA'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL35
SLB159	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH_{500}'-treA,cat)31$	SLB63 + lin. pSL28
SLB160	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH'-treA,cat)$ degS(hy)	KFB41 + gDNA PB5390
SLB163	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)27$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB144 + gDNA MD282
SLB164	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)27$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB144 + gDNA MD300
SLB165	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)26$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB152 + gDNA MD282
SLB166	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)26$, [degU32(Hy),aphA3]	SLB152 + gDNA MD300
SLB169	[degS200(Hy),spc]	168 + gDNA PB5390
SLB170	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ywqH'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB154 + gDNA MD282
SLB171	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ywqH'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB154 + gDNA MD300
SLB172	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yukE'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB155 + gDNA MD282
SLB173	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yukE'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB155 + gDNA MD300
SLB174	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yfjA'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB156 + gDNA MD282
SLB175	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yfjA'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB156 + gDNA MD300
SLB176	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(mpr'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB157 + gDNA MD282
SLB177	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(mpr'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB157 + gDNA MD300
SLB178	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yjhA'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB158 + gDNA MD282
SLB179	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yjhA'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB158 + gDNA MD300
SLB180	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH_{500}'-treA,cat)31$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB159 + gDNA MD282
SLB181	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH_{500}'-treA,cat)31$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB159 + gDNA MD300
SLB182	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)21$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB75 + gDNA 282

SLB183	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)22$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB76 + gDNA 282
SLB186	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degU'-treA,cat)2$	SLB63 + lin. pSL39
SLB187	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degU'-treA,cat)2$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB186 + gDNA MD282
SLB188	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degU'-treA,cat)2$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB186 + gDNA MD300
SLB189	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degU'-treA,cat)3$	SLB63 + lin. pSL40
SLB190	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degU'-treA,cat)3$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB189 + gDNA MD282
SLB191	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degU'-treA,cat)3$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB189 + gDNA MD300
SLB192	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ispA-treA cat)$	SLB63 + lin. pSL41
SLB193	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ispA-treA cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB192 + gDNA MD282
SLB194	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ispA-treA cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB192 + gDNA MD300
SLB195	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)23$	SLB63 + lin. pSL42
SLB196	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)23$ $\Delta degSU::aphA3$	SLB195 + gDNA MD282
SLB197	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)23$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB195 + gDNA MD300
SLB198	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)24$	SLB63 + lin. pSL44
SLB199	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)24$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB198 + gDNA MD282
SLB200	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)24$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB198 + gDNA MD300
SLB202	$\Delta(treA::neo)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA, cat)mut2$ [degS200(Hy),spc]	KFB25 + gDNA PB5390
SLB203	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yukE'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB155 + gDNA PB5390
SLB204	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\Phi(yqxIJ'-treA)1 cat$ [degS200(Hy),spc]	THB415 + gDNA PB5390
SLB205	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(phrG-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB131 + gDNA PB5390
SLB206	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(rapG-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB132 + gDNA PB5390
SLB207	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ywqH'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB154 + gDNA PB5390
SLB208	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yfjA'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB156 + gDNA PB5390
SLB209	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(mprI'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB157 + gDNA PB5390
SLB210	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yjHA'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB158 + gDNA PB5390
SLB211	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ispA'-treA cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB192 + gDNA PB5390
SLB212	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degU'-treA,cat)2$ [degS200(Hy),spc]	SLB186 + gDNA PB5390
SLB213	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degU'-treA,cat)3$ [degS200(Hy),spc]	SLB189 + gDNA PB5390
SLB214	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degS'-treA,cat)1$ [degS200(Hy),spc]	THB41 + gDNA PB5390
SLB215	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yddT'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	THB410 + gDNA PB5390
SLB216	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yitP'-treA, cat)$ [degS200(Hy),spc]	THB412 + gDNA PB5390
SLB217	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yomL'-treA, cat)$ [degS200(Hy),spc]	THB414 + gDNA PB5390
SLB218	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degSU-treA, cat)$ [degS200(Hy),spc]	THB416 + gDNA PB5390
SLB219	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(degU'-treA, cat)$ [degS200(Hy),spc]	THB417+ gDNA PB5390
SLB220	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH-treA,cat)25$	SLB63 + lin. pSL43
SLB221	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(sacB'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL19
SLB222	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(sacB'-treA,cat)$ $\Delta degSU::aphA3$	SLB222 + gDNA MD282
SLB223	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(sacB'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB222 + gDNA MD300
SLB224	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(sacB'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB222 + gDNA PB5390
SLB225	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(aprE'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL20
SLB226	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(aprE'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB225 + gDNA MD282
SLB227	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(aprE'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB225 + gDNA MD300
SLB228	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(aprE'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB225 + gDNA PB5390
SLB229	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ywsC'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL21
SLB230	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ywsC'-treA,cat)$ $\Delta degSU::aphA3$	SLB229 + gDNA MD282
SLB231	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ywsC'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB229 + gDNA MD300
SLB232	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ywsC'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB229 + gDNA PB5390
SLB233	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ycdA'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL37
SLB234	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ycdA'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB233 + gDNA MD282

SLB235	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ycdA'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB233 + gDNA MD300
SLB236	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ycdA'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB233 + gDNA PB5390
SLB237	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yvpB'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL38
SLB238	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yvpB'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB237 + gDNA MD282
SLB239	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yvpB'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB237 + gDNA MD300
SLB240	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yvpB'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB237 + gDNA PB5390
SLB241	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yfkN'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL45
SLB242	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yfkN'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB222 + gDNA MD282
SLB243	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yfkN'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB222 + gDNA MD300
SLB244	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yfkN'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB222 + gDNA PB5390
SLB245	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ynfD'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL46
SLB246	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ynfD'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB245 + gDNA MD282
SLB247	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ynfD'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB245 + gDNA MD300
SLB248	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(ynfD'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB245 + gDNA PB5390
SLB249	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(comK'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL47
SLB250	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(comK'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB249 + gDNA MD282
SLB251	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(comK'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB249 + gDNA MD300
SLB252	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(comK'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB249 + gDNA PB5390
SLB253	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(proH'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pJSB35
SLB254	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(proH'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB253 + gDNA MD282
SLB255	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(proH'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB253 + gDNA MD300
SLB256	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(proH'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB253 + gDNA PB5390
SLB257	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(opuA'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pMBB10
SLB258	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(opuA'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB257 + gDNA MD282
SLB259	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(opuA'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB257 + gDNA MD300
SLB260	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(opuA'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB257 + gDNA PB5390
SLB261	$\Delta(proHJ::tet)$, $\Delta(degSU::neo)$	TMB105 + gDNA MD282
SLB262	$\Delta(proHJ::tet)$, [degS200(Hy),spc]	TMB105 + gDNA PB5390
SLB263	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yraI'-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL48
SLB264	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yraI'-treA,cat)$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB263 + gDNA MD282
SLB265	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yraI'-treA,cat)$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB263 + gDNA MD300
SLB266	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yraI'-treA,cat)$ [degS200(Hy),spc]	SLB263 + gDNA PB5390
SLB267	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH'-treA,cat)21$ [degS200(Hy),spc]	SLB75 + gDNA PB5390
SLB268	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH'-treA,cat)22$ [degS200(Hy),spc]	SLB76 + gDNA PB5390
SLB269	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH'-treA,cat)27$ [degS200(Hy),spc]	SLB144 + gDNA PB5390
SLB270	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH'-treA,cat)26$ [degS200(Hy),spc]	SLB152 + gDNA PB5390
SLB271	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH'-treA,cat)23$ [degS200(Hy),spc]	SLB195 + gDNA PB5390
SLB272	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH'-treA,cat)24$ [degS200(Hy),spc]	SLB198 + gDNA PB5390
SLB273	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yukE'-treA,cat)$, $\Delta sigB::spc$	SLB172 + gDNA
SLB274	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yukE'-treA,cat)$ $\Delta sinI::spc$	SLB172 + gDNA
SLB275	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yukE'-treA,cat)$ $\Delta remA::kan$	SLB172 + gDNA
SLB276	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH'-treA,cat)25$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB220 + gDNA MD282
SLB277	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH'-treA,cat)25$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB220 + gDNA MD300
SLB278	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yqiH'-treA,cat)25$, [degS200(Hy),spc]	SLB220 + gDNA PB5390
SLB279	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(yukE'-treA,cat)$ $\Delta sinR::spc$	SLB172 + gDNA
SLB280	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(opuB'-treA,cat)5$	SLB63 + lin. pSTH67
SLB281	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(opuB'-treA,cat)5$ $\Delta(degSU::neo)$	SLB280 + gDNA MD282
SLB282	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(opuB'-treA,cat)5$ [degU32(Hy),aphA3]	SLB280 + gDNA MD300
SLB283	$\Delta(treA::ery)1$ amyE:: $\phi(opuB'-treA,cat)5$ [degS200(Hy),spc]	SLB280 + gDNA PB5390

SLB284	$\Delta(yukE-yueB::zeo)$	168 + PCR $\Delta(yukE-yueB::zeo)$
SLB285	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat) \Delta spo0A::kan$	SLB172 + gDNA
SLB286	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat) mut5 [degS200(Hy),spc]$	SLB34 + gDNA PB5390
SLB287	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)30$	SLB63 + lin. pSL52
SLB288	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)30 \Delta(degSU::neo)$	SLB287 + gDNA MD282
SLB289	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)30 [degU32(Hy),aphA3]$	SLB287 + gDNA MD300
SLB290	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)30, [degS200(Hy),spc]$	SLB287 + gDNA PB5390
SLB291	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)29$	SLB63 + lin. pSL53
SLB292	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)29, \Delta(degSU::neo)$	SLB291 + gDNA MD282
SLB293	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)29, [degU32(Hy),aphA3]$	SLB291 + gDNA MD300
SLB294	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)29, [degS200(Hy),spc]$	SLB291 + gDNA PB5390
SLB295	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)28$	SLB63 + lin. pSL54
SLB296	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)28 \Delta(degSU::neo)$	SLB295 + gDNA MD282
SLB297	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)28 [degU32(Hy),aphA3]$	SLB295 + gDNA MD300
SLB298	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(yqiH'-treA,cat)28, [degS200(Hy),spc]$	SLB295 + gDNA PB5390
SLB299	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(phrG'_{500bp}-treA,cat)$	SLB63 + lin. pSL55
SLB300	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(phrG'_{500bp}-treA,cat) \Delta(degSU::neo)$	SLB299 + gDNA MD282
SLB301	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(phrG'_{500bp}-treA,cat) [degU32(Hy),aphA3]$	SLB299 + gDNA MD300
SLB302	$\Delta(treA::ery)1 amyE::\phi(phrG'_{500bp}-treA,cat) [degS200(Hy),spc]$	SLB299 + gDNA PB5390

^aDie Konstruktion der Stämme ist Stichpunktartig in der letzten Spalte aufgeführt. Dabei bedeutet ein „+“ das der als erstes stehende Stamm mit dem danach folgenden Konstrukt transformiert wurde. Eine beispielhafte detaillierte Beschreibung ist Abschnitt 5.2 und dessen Unterpunkten zu entnehmen. gDNA steht für genomische DNA und lin. für ein linearisiertes Plasmid

1.3 Plasmide

Tabelle 11: Plasmide

Plasmid ^a	Beschreibung	Referenz
pJMB1	Low Copy Vektor; trägt promotorloses <i>treA</i> Reportergen und homologe Bereiche des <i>amyE</i> Genlocus zur stabilen Genomintegration in <i>B. subtilis</i> ; Amp ^R , Cml ^R	M. Jebbar und E. Bremer, unveröffentlicht
pDG1515	Derivat von BluescriptKS ⁺ ; trägt Tetracyclin-Resistenzkassette	(106)
pBB287	Plasmid trägt homologe Bereiche des <i>ytoI</i> Genlokus, zu stabilen Genomintegration	Rudner Labor
pGP1331	FLAG-Tag	(185)
p7Z6	Derivat von pMD18-T; trägt Zeocin-Resistenzkassette	(339)
pASK-IBA3	Amp ^R , Klonierungs- und Expressionsvektor, über einen <i>tetA</i> Promotor und C-terminalen <i>Strep</i> -tag II	IBA Göttingen
pSL3	<i>yqiH</i> -FLAG	Diese Arbeit
pSL7	<i>yqiI</i> -FLAG	Diese Arbeit
pSL11	<i>yqiK</i> -FLAG	Diese Arbeit
pSL15	<i>aprE</i> -FLAG	Diese Arbeit
pKF13	<i>yqiH'-treA</i> (300 bp)	(87)
pTH3	pASK-IBA3 Derivat, welches das <i>degS</i> Gen von <i>B. subtilis</i> in der <i>BsaI</i> Restriktions-Seite hat	(110)
pTH4	pASK-IBA3 Derivat, welches das <i>degU</i> Gen von <i>B. subtilis</i> in der <i>BsaI</i> Restriktions-Seite hat	(110)
pTH17	<i>degU'-treA</i> (1000 bp)	(110)

^ain dieser Liste sind nicht die konstruierten pPink Derivate aufgelistet, diese sind in Tabelle 18 zu finden

1.4 Oligonukleotide

Tabelle 12: Oligonukleotide

Bezeichnung ^a	5' → 3' Sequenz ^b	Bemerkung
Deletions-Insertions Mutanten		
rapG_phrG_tet_P1	GATTTCTTCAGCATAATTTGTGGTCTTTAC	5' – Flanke von <i>rapG</i>
rapG_phrG_tet_P2	CATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATC <u>GATCTTATTCATGTGAACTCCTTTCTCTA</u>	5' – Flanke von <i>rapG</i>
rapG_phrG_tet_P3	<u>CCGTAATGCTATGTTAGCATTACTCTTTTC</u> GAGAAAATGATTGGATAAATGAAAAACCCC	3' – Flanke von <i>phrG</i>
rapG_phrG_tet_P4	CAACAAAGTCATTGAAGAGAAAAAATTCCC	3' – Flanke von <i>phrG</i>
rapG_phrG_tet_revP2	<u>TAGAGAAAGGAGTTTCACATGAATAAGATC</u> GATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATG	Tetracyclin Resistenzkassette
rapG_phrG_tet_revP3	GGGGTTTTTCATTTATCCAATCATTTTCTC <u>GAAAAGAGTAATGCTAACATAGCATTACGG</u>	Tetracyclin Resistenzkassette
phrG_tet_P1	CGTTTATTTGAAGAAGTGAAGCCTTTATTG	5' – Flanke von <i>phrG</i>
phrG_tet_P2	CATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATC <u>CATTTATATAACCTCCGTTTCGTTTAATCAG</u>	5' – Flanke von <i>phrG</i>
phrG_tet_P2rev	<u>CTGATTAAACGAACGGAGGTTATATAAATG</u> GATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATG	Tetracyclin Resistenzkassette
T7SS_zeo_P1_for	AAAAATTCTTGGCTGCGTTCTTCATTTTTTC	5'- Flanke von <i>yukE</i>
T7SS_zeo_P2_rev_2	GTATAATGTATGCTATACGAACGGTAGAAT <u>CAGCCTAAATATGGGCTAATTCATTATTT</u>	5'- Flanke von <i>yukE</i>
T7SS_zeo_P3_for	<u>GTATAGCATACATTATACGAACGGTAGAAT</u> TTGTGTAAAAGAGGTGCCGTACAATAATAA	3'-Flanke von <i>yueD</i>
T7SS_zeo_P4_rev	TGGGTGAAAACATCCATTAATGTAACCTTT	3'-Flanke von <i>yueD</i>
T7SS_zeo_P2_for_2	<u>AAATAAGTGAATTAGCCCATATTTAGGCTG</u> ATTCTACCGTTTCGTATAGCATACATTATAC	Zeocin Resistenzkassette
T7SS_zeo_P3_rev	TTATTATTGTACGGCACCTCTTTACACAA <u>ATTCTACCGTTTCGTATAATGTATGCTATAC</u>	Zeocin Resistenzkassette
FLAG-Tag Konstruktion		
yqiH tag for (kurz)	CTA GAATTC AAACAAACGGTTCTTTTG	<i>EcoRI</i> Erkennungssequenz
yqiH tag rev (kurz)	GTAG TCGAC CGAGTTCTTTTCGCAGCTG	<i>Sall</i> Erkennungssequenz
yqil tag for	CTAG TCGAC AGCTTGGCGCTGTGCGGA	<i>Sall</i> Erkennungssequenz
yqil tag rev	GTAC TCGAC CTGATCATAATAAGAATC	<i>PstI</i> Erkennungssequenz
yqik tag for	CTA GAATTC CGCATTGTTGTAATTCAT	<i>EcoRI</i> Erkennungssequenz
yqik tag rev	GTAG TCGAC TTCAATTTTTCAGCAATGC	<i>Sall</i> Erkennungssequenz
aprE tag for	CTA GAATTC CAATAACTCAATCGGTGTT	<i>EcoRI</i> Erkennungssequenz
aprE tag rev	GTAG TCGAC TTGTGCAGCTGCTTGAC	<i>Sall</i> Erkennungssequenz
aprE control PCR for	GATGTCTTTGCTTGGCGAAT	5' Flanke <i>aprE</i>
aprE control PCR rev	CGAAATGGGCCATTATGTCA	3' Flanke <i>aprE</i>
P1H	GTTTTCGGAGAATAAACTGCTGAATTAAG	5' Flanke <i>yqiH</i>
P4K	TTTCACATGTCAAAACAACGAAGCAAAAG	3' Flanke <i>yqiK</i>
Mutagenese des <i>degSU</i> Lokus		

DegU D56N rev	ATTTACGTTTGGCATATTGATATTCATGATCACAACATCA GGATGAT	Phosphorylierungsstelle
DegU D56N for	ATCATCCTGATGTTGTGATCATGAATATCAATATGCCAA ACGTAAAT	Phosphorylierungsstelle
P2_-10_GGG_for	GGACATTTATGGGGATTAAGGTTCCGTTATC	<i>degU_{P2}</i> -10 Region
P2_-10_GGG_rev	CAAGACCTATTTTCGAATCTATTG	<i>degU_{P2}</i> -10 Region
P3_-10_GGG_for	TATATAGAACGGGAATACAAGGAGGCGTG	<i>degU_{P3}</i> -10 Region
P3_-10_GGG_rev	CTCTAGCATTCCGGTCAATATG	<i>degU_{P3}</i> -10 Region
Mutagenese in dem <i>yqiH</i> Promotorbereich		
DegU_yqiH_MitteBS for	GGGCGATTTGCTCACCTATTCTCAGGTTTTTAAAATG AATAAAAAGTTGCT	2. putative Bindestelle
DegU_yqiH_MitteBS rev	AGCAACTTTTTATTCATTTTAAAAACCTGAGAATAGGGT GAGCAAATCGCCC	2. putative Bindestelle
DegU_yqiH_letzteBS for	GATTTGCTCACCTATTCTCAGGTTTTTAAGGTGAATA AAAAGTTGCTTCTTTC	2. und 3. putative Bindestelle
DegU_yqiH_letzteBS rev	GAAAGAAGCAACTTTTTATTACCTTAAAAACCTGAGA ATAGGGTGAGCAAATC	2. und 3. putative Bindestelle
DegU_yqiH_ersteBS for	CATGAGAATTCCTGGGCGACCTGCTCACCTATTCTC	Erste putative Bindestelle
DegU_yqiH_ersteBS rev	GAGAATAGGGTGAGCAGGTCGCGGGAATTCTCATG	Erste putative Bindestelle
3.BS_alleine_for	AATTTTTTAAGGTGAATAAAAAGTTGCTTCTTTCCG	3. putative Bindestelle
3.BS_alleine_rev	TGAGAATAGGGTGAGCAATG	3. putative Bindestelle
yqiH_del_inter_for	TGCATTGCGTTGTCTTTAC	Δ109 bp und Δ133 bp
yqiH_del_inter_kurz_rev	AATTAGAAAAAATTAGCGGAAAGAAG	Δ109 bp
yqiH_del_inter_lang_rev	AGCAACTTTTTATTCATTTTAAAAAATTG	Δ133 bp
yqiH_del_inter_mittel_for	TATAGCCCTTTTGAAATCATG	Δ74 bp
yqiH_del_inter_mittel_rev	AATTAGAAAAAATTAGCGGAAAG	Δ74 bp
Mutagenese des Plasmids pJMB1		
pJMB1_insertion_for	CACCATATTTGGGGATCCATCCCGGGAATTCTCATGT	Verbesserung der Schnittstellen
pJMB1_insertion_rev	ACATGAGAATTCCCGGGATGGATCCCCAAATATGGTG	Verbesserung der Schnittstellen
<i>treA</i> Fusionen in pJMB1		
yukE_treA_for	CTACCCGGGCTCATCCCTTCCTTTTATTATG	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
yukE_treA_rev	GATGGATCCCTCTTAGCTCTTCGGGTGTG	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
ywqH_treA_for	CTACCCGGGCAAGCTTTTGATCCAAAGGG	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
ywqH_treA_rev	GATGGATCCGCGAACTTTTGATATCCGCTAG	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
yfjA_treA_for	CTACCCGGGGACGACCTCCTTGATAACGT	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
yfjA_treA_rev	GATGGATCCCACTATACTTGTGGCCAGCTC	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
ispA_treA_for	CTACCCGGGCGAGTTGAATCCAGTCATAC	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
ispA_treA_rev	GATGGATCCATTGCTCACATACGGGATC	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
sacB_treA_for	ATACCCGGGAACCCATCACATATACCTGC	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
sacB_treA_rev	TATGGATCCAGTGCGGTAGTAAAGGTTA	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz

aprE_treA_for	ATACCCGGGCTTATTTCTCCTCCCTCTCAA	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
aprE_treA_rev	TATGGATCCTTAACGCAAACAACAAGCTG	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
ycdA_treA_for	ATACCCGGGCCTTCTTAAGTTCCCTCCAA	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
ycdA_treA_rev	TATGGATCCGCAGAAGAATTAGGAAAACAGC	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
yfkN_treA_for	ATACCCGGGGATTTCATAACCTCCCGCTTT	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
yfkN_treA_rev	TATGGATCCGGAGAATGTTTTCGACGTGT	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
ywsC_treA_for	ATACCCGGGCATGAACAATCCGAAGTTAGC	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
ywsC_treA_rev	TATGGATCCACCAGTATGACAGCACAG	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
ynfF_treA_for	ATACCCGGGGATATGGATTACTATAGCGGACA	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
ynfF_treA_rev	TATGGATCCCCAGATAAGCAGCTCAATAA	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
yvpB_treA_for	ATACCCGGGACCTCCGCTGTTATCTTATG	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
yvpB_treA_rev	TATGGATCCCTGAAAGAATCATCAGGACACA	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
xynD_treA_for	ATACCCGGG	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
xynD_treA_rev	TATGGATCC	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
yqiH-treA 500 bp fwd	ATACCCGGGCCGACTGAATATCTTGAGTGCAG	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
yrat_treA_for	ATACCCGGGGACTCGCAAAATCATAGAATAACG	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
yrat_treA_rev	TATGGATCCGACTTTCTTACATCCAGTTAAGG	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
phrG-treA_2_for	ATACCCGGGGGAAGCAATTCGGATCACGAG	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
phrG-treA_rev	TATGGATCCGACGCCTGCGCCAATCAG	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
rapG-neu	ATACCCGGGGTTCTGTCTGCATAGGGGTTAG	<i>BamHI</i> Erkennungssequenz
rapG-treA-rev	TATGGATCCGTTGAGCATGCTAGCGATTT	<i>SmaI</i> Erkennungssequenz
Sequenzierungsprimer		
pJMB1-pFSB1_Seq_for	ATAAGGGTAACTATTGCCG	pJMB1
pJMB1_Seq_rev	ACCATTTCTGTGTCGTATCG	pJMB1
degSU_Seq_for_1	GTAAAATAGCTGTGCAGCAT	degSU Lokus
degSU_Seq_for_2	GAATCAGGATTTGCGCGAAG	degSU Lokus
degSU_Seq_for_3	GGTTCCGTTATCTCTTTGAC	degSU Lokus
degSU_Seq_for_4	CCGTTAAAAACCATGTCAGC	degSU Lokus
degSU_Seq_rev_1	GCTTCGATACCTGCCTTATT	degSU Lokus
degSU_Seq_rev_2	CCTTCGGCTACCACTTCAAA	degSU Lokus
degSU_Seq_rev_3	CCGAACATTTTGCGGAGAT	degSU Lokus
degSU_Seq_rev_4	CCAGCACTTTGGAATCCATC	degSU Lokus
treA_for	GTAAGTACTTCAGGGCTTATC	treA Insertion

<i>treA</i> _rev	CATATGGTCATAGCCGCGTA	<i>treA</i> Insertion
Northern Blot Primer		
NB <i>yqiH</i> LK for	CATGATACAAGTTCCGAAGG	<i>yqiH</i> LK Sonde
NB <i>yqiH</i> LK rev	TAATACGACTCACTATAGGGAG GTGAATATCGGATGCCAGACG	<i>yqiH</i> LK Sonde
NB <i>degS</i> for	ACCGTTGACGGGAGCAAGGACG	<i>degS</i> Sonde
NB <i>degS</i> rev	TAATACGACTCACTATAGGGAG GCGCTCTTCTTCTGCGCCTC	<i>degS</i> Sonde
NB <i>degU</i> for	CCTACCTTTGAAGTGGTAGCCG	<i>degU</i> Sonde
NB <i>degU</i> rev	TAATACGACTCACTATAGGGAG GCCGTCTGCAAGCATCTGCAGC	<i>degU</i> Sonde
NB <i>rapG</i> for	GATGACATGGAAGAGGATCAG	<i>rapG</i> Sonde
NB <i>rapG</i> rev	TAATACGACTCACTATAGGGAG GCTGTCATACTCTTCTCGGAC	<i>rapG</i> Sonde
NB <i>phrG</i> for	ATGAAAAGATTTCTGATTGGCGCAG	<i>phrG</i> Sonde
NB <i>phrG</i> rev	TAATACGACTCACTATAGGGAG GTCCAATCATTTTCTCAGCGACTTTC	<i>phrG</i> Sonde
<i>trnB</i> -Ala-for	GGGGCCTTAGCTCAGCT	<i>trnB</i> Sonde
<i>trnB</i> -Ala-rev	TAATACGACTCACTATAGGGAG AAGTGGAGCCTAGCGGG	<i>trnB</i> Sonde

^aDie Oligonukleotide wurden Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), sowie von Microsynth (Balgach, Schweiz) bezogen.

^bDie Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen wurden, falls vorhanden, in Rot dargestellt. Für Deletionen waren überlappende Bereiche erforderlich, diese sind unterstrichen. Und die T7-Promotor Sequenz ist in fett dargestellt

2 Medien und Wachstumsbedingungen

2.1 diverse Medien

Zur Vermehrung und Stammhaltung der diversen *E. coli* und *B. subtilis* Stämme, wurde das Komplexmedium LB (Luria-Bertani) verwendet (216). Festmedien wurden darüber hinaus zusätzlich mit 1.5 % (w/v) Agar als Endkonzentration versetzt.

Die Kultivierung der verschiedenen *B. subtilis* Derivate (Tabelle 9) erfolgte in Spizizen's Minimalmedium (SMM) (297). Zur Vervollständigung des Mediums wurden 0,5 % (w/v) Glukose als Kohlenstoffquelle sowie eine Lösung von Spurenelementen (115) ergänzt. Die Zugabe von L-Tryptophan (20 mg/l) diente der Komplementierung der Tryptophan-Auxotrophie des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes 168 und dessen Derivaten.

Für die Experimente der salzabhängigen und DegU-P regulierten Gene wurde Helmann Minimalmedium verwendet (61, 299). Die Komponenten des Mediums sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Komponenten des Helmann Minimalmediums

Spurenelemente		Medium-Stock		Weiter Komponenten	
Chemikalie	Endkonzentration [nM]	Chemikalie	Endkonzentration [g/L]	Chemikalie	Endkonzentration
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄	3	(NH ₄) ₂ SO ₄	2	MOPS (pH7,4	40 mM

H ₃ BO ₃	400	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	einstellen)	
				Kaliumphosphat	
CoCl ₂	30	Natriumcitrat	1	Puffer (pH7.0	2 mM
		*2H ₂ O		einstellen)	
CuCl ₂	10	Kaliumglutamat	1	Tryptophan	8 mg/L
ZnCl ₂	10			Glukose	2 %
MnCl ₂	80			FeCl ₃	250 µM

Für osmotische Stressexperimente wurde die Osmolarität des Mediums durch die Zugabe einer konzentrierten NaCl (5 M) Stammlösung erhöht. Weiterhin wurden für die Stress-Experimente eine 1.2 M KCl Lösung, eine 11,35 M Glycerin, sowie eine 2 M Saccharose Stammlösung angesetzt. Lactose wurde direkt eingewogen (22g/100ml) und hinter mit HMM aufgefüllt.

2.2 Medienzusätze und Antibiotika

Antibiotika und andere Medienzusätze (Glycin-Betain) wurden als konzentrierte Stammlösung in destilliertem Wasser oder Ethanol angesetzt und steril filtriert (Tabelle 14). Die Antibiotika wurden den Medien nach dem Autoklavieren und dem anschließenden Abkühlen auf circa 60 °C beigefügt. Die Konzentrationen der Stammlösungen und deren Endkonzentrationen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 14: Antibiotika und Medienzusätze

Medienzusatz	Stocklösung	Lösungsmittel	Endkonzentration E. coli	Endkonzentration B. subtilis
Erythromycin	2 mg/ml	70 % EtOH	-	2 µg/ml
Chloramphenicol	5 mg/ml	70 % EtOH	-	5 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml	ddH ₂ O	-	10 µg/ml
Spectinomycin	100 mg/ml	ddH ₂ O	-	150 µg/ml
Zeocin	100 mg/ml	ddH ₂ O	-	35 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml	70 % EtOH	-	15 µg/ml
Ampicillin	100 mg/ml	ddH ₂ O	100µg/ml	-
Glycin-Betain	1 M	ddH ₂ O	-	1 mM

2.3 Sterilisation

Hitzeunempfindliche Lösungen und Medien wurden mindestens 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Temperaturempfindliche Lösungen, wie Antibiotika und compatible Solute wurden steril filtriert (Steril Filter mit 0,2 µm Porengröße, Carl Roth). Die Sterilisation von Glaswaren erfolgte für mindesten 2 Stunden bei einer Temperatur von 180°C.

2.4 Wachstumsbedingungen und Vermehrung von Bakterien

Alle Kulturen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden je nach Volumen (bis 5 ml im Reagenzglas, darüber im Erlenmeyer-Kolben, bei dem das Volumen das Kultivierungsvolumen um das 5-fache übersteigt) auf einem Roller oder einem Schüttler inkubiert. Um die

aeroben Bedingungen im Erlenmeyer-Kolben zu gewährleisten wurden die Kulturen bei 220 rpm geschüttelt. Festmedien wurden zunächst bei 37 °C im Wärmeschrank vorgewärmt und anschließend mit einer sterilen Glaspipette beimpft. Die beimpften Platten wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

B. subtilis

Für alle Experimente mit *B. subtilis* wurden zunächst 3 ml LB Vorkultur mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte beimpft und nach 3 Stunden wurde mit dieser LB Kultur eine Verdünnungsreihe in Minimal-Medium über Nacht angeimpft, welche dann am nächsten Morgen genutzt wurde um die Hauptkulturen anzupflanzen.

Um Hoch-Salz Kulturen anzupflanzen, wurde morgens *B. subtilis* in 3 ml LB angeimpft, nach 3 Stunden wurden 200 µl in 20 ml Minimal Medium überführt und diese dann bis zur exponentiellen Phase (OD_{578} 1,0-1,5) wachsen gelassen. Mit dieser Minimal Medium Vorkultur wurden die Hoch-Salz Hauptkulturen auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft. Die NaCl-Konzentration der Hauptkultur wurde so eingestellt, dass nach der Inokulation mit der Vorkultur, die gewünschte Endosmolarität erreicht wurde.

Für die Protein-Lokalisation und der damit verbundenen Isolierung der sekretierten Proteine wurden Kulturen von 100 ml – 200 ml benötigt. Für alle weiteren Experimente wurden 20 ml Hauptkulturen genutzt.

E. coli

Für Plasmid-Mini-Präparationen wurden 5 ml Kultur über Nacht im Reagenzglas bei 37 °C auf einem Roller inkubiert. Für Maxi-Präparationen wurden 500 ml im 1000 ml Erlenmeyerkolben im Luftschüttler oder Wasserbad inokuliert.

2.5 Bestimmung der Osmolarität

Die Bestimmung der Osmolarität verschiedener Wachstumsmedien erfolgte mit einem "Vapour pressure" Osmometer (Modell 5.500, Wescor). Hierbei wurde das Osmometer zunächst mit Kalibrierungslösungen von 250 mosmol (kg Wasser)⁻¹ und 1000 mosmol (kg Wasser)⁻¹ kalibriert, um danach die Osmolarität der eigentlichen Proben zu bestimmen. Medien mit einer Osmolarität über 1000 mosmol (kg Wasser)⁻¹ wurden mit Wasser verdünnt um im linearen Bereich der Kalibration zu bleiben.

2.6 Ermittlung der Zelldichte

Die Ermittlung der Zelldichte der Bakterienkulturen erfolgte photometrisch (Ultrospec 2100 *pro*) bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD_{578}). Dabei wird angenommen, dass einer OD_{578} von 1 eine Zellzahl von etwa $1 \cdot 10^9$ Zellen pro 1 ml entspricht (216). Zellsuspensionen ab einer OD_{578} von 0,5 wurden zur Messung mit dem verwendeten Medium verdünnt.

2.7 Transformation von *B. subtilis* und *E. coli*

2.7.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von *B. subtilis*

B. subtilis besitzt im Gegensatz zu anderen Bakterien eine natürliche Kompetenz und kann somit ohne zusätzliche chemische oder physikalische Behandlung DNA aus der Umgebung aufnehmen. Es wurde die Methode nach Cutting und Vander Horn in abgewandelter Form angewendet (70). Im Detail wurden

hierfür 3 ml SMM mit einer Einzelkolonie von einer frisch ausgestrichenen LB-Agarplatte des zu transformierenden Stammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Roller inkubiert. Mit 1 ml dieser Übernachtskultur wurden anschließend 20 ml des vorgewärmten LS- Mediums (Tabelle 15) beimpft und für 3 Stunden im Wasserbad inkubiert (100 rpm, 30 °C). Der zu transformierende *B. subtilis* Stamm befindet sich nun am Beginn der stationären Phase und ist für kurze Zeit in der Lage, die ihm zugeführte DNA ins Zellinnere aufzunehmen und ins Genom zu integrieren.

Für die Transformation wurde 1 ml der in LS-Medium gewachsenen *B. subtilis* Kultur mit 10 µg Plasmid-DNA oder 1 µg chromosomaler DNA vermischt. Der Transformationsansatz wurde dann für 2 Stunden bei 37 °C auf dem Roller inkubiert, anschließend auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die erhaltenen Transformanten wurden jeweils zweimal auf Antibiotika-Platten aufgereinigt und anschließend auf das Vorhandensein (möglicher) ursprünglicher Resistenzen hin überprüft.

Tabelle 15: Komponenten des LS-Mediums

10x S-Base		LS-Medium	
	Endkonzentration		Endkonzentration
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,15 M	10x S-Base	1x
K ₂ HPO ₄	0,8 M	MgCl ₂	0,0025 M
KH ₂ PO ₄	0,44 M	Glukose	0,5 %
Natriumcitrat	0,03 M	L-Tryptophan	20 mg/l
MgSO ₄	0,001 M	Caseinhydrolysat	0,01 %
		Hefextrakt	0,1 %
		Spermin	0,5 mM

2.7.2 Präparation kompetenter Zellen und Transformation von *E. coli*

Die Präparation chemisch kompetenter DH5α und Top10 Zellen erfolgte mit CaCl₂. Hierbei wurde eine LB über Nacht Kultur des entsprechenden *E. coli* Stamms 1:100 in frisches Medium verdünnt und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,7 wachsen gelassen. Die Zellen wurden geerntet (4700 rpm, 10 min, 4 °C) und danach zweimal mit eiskalten 50 mM CaCl₂ gewaschen. Danach wurde das Pellet in 1/100 Volumen von der Ausgangskultur in eiskalten 50 mM CaCl₂ resuspendiert. 100 µl Aliquots wurden mit 20 µl 50% Glycerin gemischt und in flüssigen Stickstoff eingefroren und dann bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden 0,1-1 µg DNA in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst auf Eis aufgetaut, danach wurde die Plasmid DNA zugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für eine Minute und die sofortige Abkühlung auf Eis für 5 Minuten. Danach erfolgte die phänotypische Expression in dem die Zellen für eine Stunde bei 37 °C mit 1ml LB inkubiert wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension auf LB Agar Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

Für die Transformation von mutagenisierten Plasmiden (QuickChange II XL Site directed mutagenesis Kit oder NEB Q5 site directed mutagenesis Kit) wurden die zu dem jeweiligen Kit gehörenden, vom Hersteller kompetent gemachten, Zellen genommen. Die anschließende Transformation erfolgte nach Angaben des Herstellers (NEB und Agilent Technologies, La Jolla, USA).

3 Molekularbiologische Methoden

Jede in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden mit mindestens zwei technischen sowie zwei biologischen Parallelen durchgeführt.

3.1 DNA Techniken

3.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Die Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis* erfolgte nach dem Protokoll von Marmur (206). Die chromosomale DNA wurde dafür aus 5 ml einer *B. subtilis* Kultur präpariert, die zuvor mit einer Einzelkolonie angeimpft wurde. Die Inkubation erfolgte für drei Stunden bei 37 °C. Die Kulturen wurden danach zentrifugiert (5 min, 10.000rpm), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 500 µl Saline-EDTA (pH 8) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über die Zugabe von 50 µl Lysozym (50 mg/ml) und einer Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C, sowie der anschließenden Zugabe von 50 µl 20% SDS und einer Inkubation bei 60 °C für circa 10 Minuten. Das erhaltene klare Lysat wurde mit 120 µl 5 M Na-Perchlorat und 800 µl Chloroform; Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und bei starken Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation (13000 rpm, 15 Minuten), nach der die entstandene obere Phase die DNA erhält. Die Phase wurde abgenommen und mit eiskalten 100 % Ethanol gefällt. Die chromosomale DNA wurde durch erneute Zentrifugation pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das DNA Pellet wurde dann in 0,1-0,5 ml ddH₂O aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse (27) angewandt. Plasmid-DNA, die zur Klonierung eingesetzt werden sollte, wurde über QIAGEN-Säulen (tip-100) präpariert (QIAGEN Plasmid Midi Kit). Die Herstellerangaben wurden folgendermaßen modifiziert: Die Puffer P1, P2 und P3 wurden immer in doppelter Menge hinzugefügt. Alle weiteren Schritte wurden, wie im Handbuch von QIAGEN (Hilden, D) beschrieben, durchgeführt. Zur DNA-Sequenzierung benötigte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Gene JET Miniprep Kits von Thermo Fisher Scientific Inc. Life Sciences (St. Leon-Roth, D) isoliert.

3.1.3 Bestimmung der Konzentration von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mit Hilfe eines UV/VIS-Spektralphotometers (NanoDrop® ND-10.000, PeqLab, Erlangen, D) bei drei Wellenlängen (230nm, 260nm und 280nm). Eine A₂₆₀ von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 37 µg/ml an einzelsträngiger-DNA oder ca. 40 µg/ml an RNA entspricht (280). Der Koeffizient A₂₆₀/A₂₈₀ gibt Aufschluss über eine mögliche Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen und liegt im Idealfall zwischen 1,8 und 2,0. Eine hohe A₂₃₀ und folglich ein niedriges Verhältnis von A₂₆₀/A₂₃₀ deutet auf eine Kontamination der Nukleinsäuren durch organischen Verbindungen hin. Bei einem Verhältnis von A₂₆₀/A₂₃₀ > 2 liegt in der Regel keine Verunreinigung vor.

3.1.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode um selektiv Genfragmente zu vervielfältigen. Als Template wurde entweder chromosomale DNA (100ng/100µl PCR Ansatz) oder ein zirkuläres Plasmid (10ng/100µl PCR Ansatz) verwendet. Für die Überprüfung einer Insertions-Deletionsmutante wurde die Taq-Polymerase verwendet, da kein Proof-Reading nötig ist. Für PCR-Fragmente die zur weiteren Klonierung oder Sequenzierung dienen, wurde die Phusion Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) verwendet. Die Volumina der Ansätze wurden den anschließenden Experimenten angepasst und entsprachen den Angaben der Hersteller. Die Thermoprofile wurden auch den Herstellerangaben entnommen und in einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, D) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 12 aufgelistet.

3.1.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

DNA Fragmente (PCR-Produkte und Restriktionsverdaue) werden nach ihrer Größe über ein 1% Agarosegel in TAE Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure und 1 mM EDTA) getrennt. Die Nukleinsäureproben werden vor der Auftragung mit einem sechsfachen Ladebuffer (0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol, 50 % Glycerin) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 120 V angelegt und die Gele für circa 1 Stunde laufen gelassen. Als Größenstandard diente der 1 kB DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). Nach der Auftrennung wurden die Gele mit einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml TAE Puffer) für circa 10 Minuten gefärbt. Die Visualisierung der Nukleinsäurebanden erfolgte auf einem UV-Tisch mit einer UV-Anregung von 302 nm, was eine Fluoreszenz von den in der DNA-Doppelhelix interkalierenden Ethidiumbromidmolekülen verursacht. Diese wurde dann mit der Video-Dokumentationsanlage (INTAS GmbH, Göttingen) fotografiert.

3.1.6 Restriktionsverdau und Ligation

Zum Verdau von Plasmid-DNA sowie von PCR-Amplifikaten, wurden Ansätze von einem Gesamtvolumen von 20-50 µl mit 0,1-1 µg DNA verwendet. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (St. Leon-Rot, D) bezogen. Die eingesetzten Enzymmengen sowie die dazugehörigen Puffer und Inkubationszeiten entsprachen dabei den Angaben des Herstellers. Die Kontrolle der DNA-Restriktion erfolgte anschließend über eine Agarosegelelektrophorese. Danach erfolgt die Dephosphorylierung des 5'-Endes der Plasmide mit der thermo-sensitiven Alkalinen Phosphatase (FastAP) nach Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific Inc., Life Science, St. Leon-Rot, Deutschland). Zur Konstruktion diverser Vektoren (Tabelle 11 und Tabelle 18) wurden der geschnittene Vektor, sowie das PCR Fragment gereinigt und danach in eine Ligation eingesetzt. Hierbei wurden 50-100 ng Plasmid-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss an der zu inserierenden DNA mit der T4 DNA Ligase laut Herstellerangaben ligiert (Thermo Fisher Scientific Inc.). Eine Abweichung ist die Inkubationszeit, die über Nacht bei 16 °C im Wasserbad und anschließend nochmal eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgte.

3.1.7 Reinigung von DNA

Um Primer und Salze aus den PCR Produkten zu entfernen wurden diese mit einem „GeneJET PCR Purification Kit“ laut Herstellerangaben gereinigt (Thermo Fisher Scientific Inc., Life Science, St.Leon-Rot, Deutschland).

Um PCR Fragmente anzukonzentrieren und zu reinigen wurde die DNA mit Ethanol und Na-Acetat wie folgt gefällt. Zu der PCR wurden 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und das Zweifache Volumen an 100 % Ethanol gegeben. Die Fällung erfolgte bei -20 °C über Nacht. Am nächsten Morgen wurde die DNA pelletiert (13000 rpm, 4 °C, 60 Minuten) und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das daraus resultierende Pellet wurde in einem maximalen Volumen von 50 µl ddH₂O resuspendiert.

Linearisierte Plasmide wurden vor der Ligation mit den Wizard Säulchen von Promega (Mannheim, D) gereinigt. Hierfür wurden bis zu 300 µl aufzureinigendes Produkt mit 100 µl „direct purification buffer“ gemischt und danach wurde 1ml resuspendierter Resin hinzugefügt. Diese Suspension wurde unter langsamen schwenken 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit einer Spritze in die Wizard Säulchen gedrückt. Danach wurde die Säule mit 2 ml 80 % Isopropanol gewaschen und zum Trocknen für 20 Sekunden bei 5000 rpm zentrifugiert. Als nächstes wurde die Säule in ein neues Eppi gestellt und 40 µl ddH₂O auf die Säule gegeben. Um die Elution zu optimieren wurde die Säule für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach bei 5000 rpm für 20 Sek zentrifugiert.

3.1.8 Konstruktion einer Deletion-Insertions-Mutante

Für die Konstruktion einer Gendeletion auf dem Chromosom von *B. subtilis*, wurde das Zielgen durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette deletiert. Es wurde dazu die LFH-PCR-Methode (*Long Flanking Homology*) angewendet, die in zwei PCR-basierenden Schritten erfolgt (182).

Im Ersten Schritt werden zunächst drei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt: (i) 5'-Region des Zielgens (Primer P1 und P2), (ii) 3'-Region des Zielgens (Primer P3 und P4) und (iii) Antibiotika-Kassette (Primer P2rev und P3rev). Die Primer P2 und P3 verfügen über 30 bp lange Überhänge, welche komplementär zur ausgewählten Antibiotika-Resistenzkassette sind. Die Primer P2rev und P3rev verfügen ebenfalls über 30 bp lange Überhänge, die aber komplementär zur 5'- beziehungsweise 3'-Region des Zielgens sind.

Im zweiten Schritt werden die drei zuvor gereinigten PCR-Fragmente, aufgrund ihrer komplementären Enden, in einer Fusions-PCR unter Verwendung der Primer P1 und P4 zusammengefügt.

Anschließend wurde *B. subtilis* mit dem Fusionskonstrukt transformiert und auf Antibiotika-Platten, die der inserierten Antibiotika Kassette entsprechen, ausplattiert um zu gewährleisten das ein Selektionsdruck vorhanden ist, sodass die Deletion ins Chromosom integriert. Der stabile Einbau des Konstrukts ins Chromosom wird durch homologe Rekombination, durch die komplementären Bereiche der 5' und 3' Flanke des Zielgens hervorgerufen. Die Deletion des Zielgens geht somit mit der Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette einher. Die exakte Integration wurde mittels PCR kontrolliert. Hierbei wurde die chromosomale DNA der Mutante sowie des Wildtyp Stammes isoliert, die entsprechenden DNA Bereiche mit den Primern P1 und P4 amplifiziert und die Amplifikate mit einander verglichen.

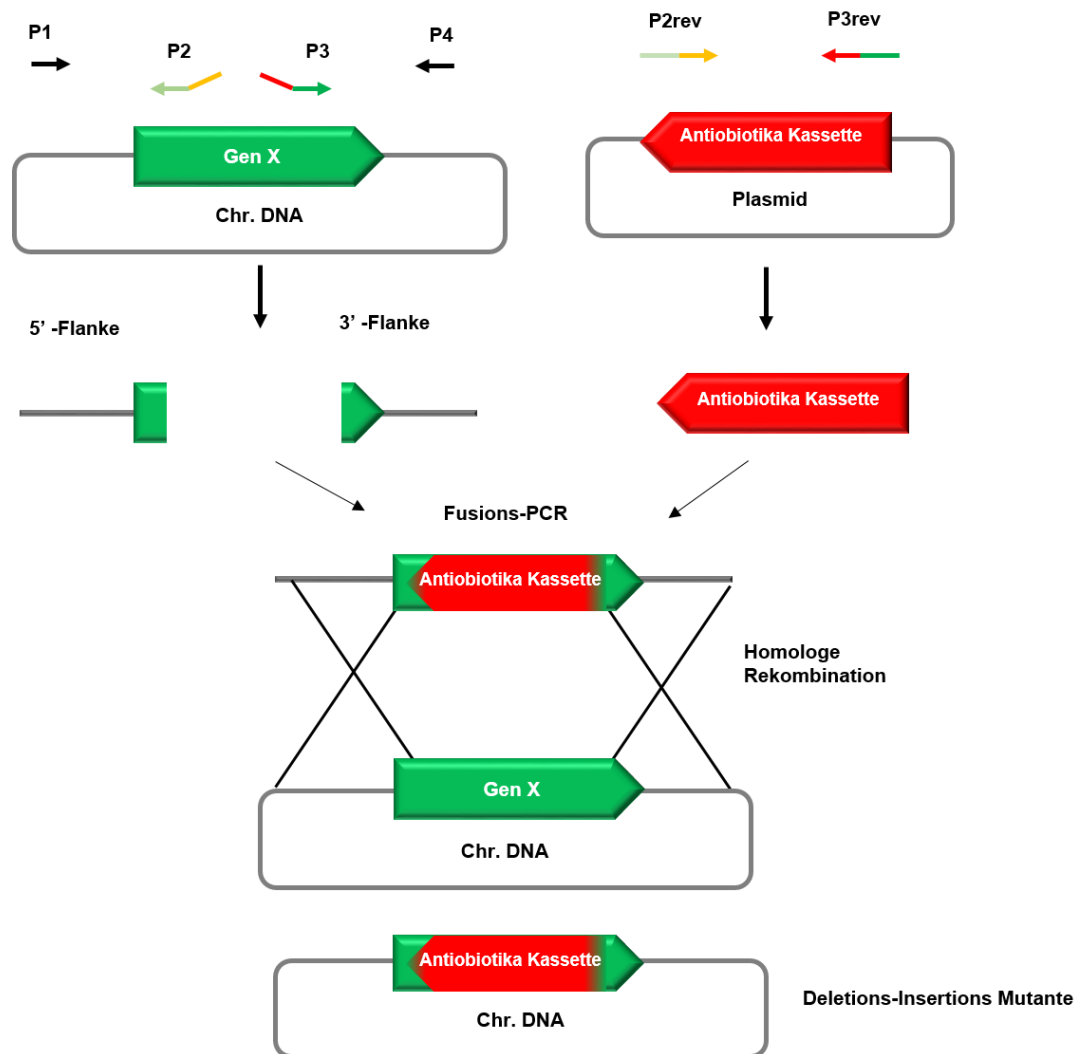


Abb. 43: Konstruktion einer Deletion-Insertions-Mutante

Schematische Darstellung zur Konstruktion einer Gendeletion in *B. subtilis*. Die Lage der verschiedenen Primer, die zur Amplifikation der 5' Flanke, 3' Flanke sowie der Antibiotika-Kassette benötigt werden, sind gekennzeichnet

3.1.9 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Einführung von diversen Punktmutationen in die *yqiHIK* und *degSU* Promotorregionen (Abb. 44 und Abb. 45) von *B. subtilis* wurden das QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, La Jolla, USA) oder das NEB Q5 site directed mutagenesis gibts nach Angaben des Herstellers verwendet. Die hieraus resultierenden mutierten Plasmide sind den Tabelle 16 und Tabelle 17 zu entnehmen.

Zunächst wurden dafür spezifische Oligonukleotide generiert, die die gewünschten Punktmutationen oder Deletionen beinhalteten. Durch die Anlagerung dieser Oligonukleotide an doppelsträngige Plasmid-DNA wird die Einbringung der Zielmutation *in vitro* gewährleistet. Als Template wurden die Plasmide pKF13, welches den Promotorbereich von *yqiHIK* an das *treA*-Reportergen fusioniert trägt und pTH4 (Tabelle 11), welches die Promotorregion von *degU* an das Reportgen *treA* fusioniert trägt, eingesetzt.

Die Konzentration der Plasmid-DNA betrug in beiden Fällen 10 ng. Die zur Einbringung der diversen Punktmutationen notwendigen Oligonukleotide sind Tabelle 12 zu entnehmen. Nach erfolgreicher Transformation der mutagenisierten Plasmid-DNA in chemisch kompetente XL 10 – Gold Zellen oder in

NEB5 α Zellen wurde erneut Plasmid-DNA von positiv selektionierten Transformanten isoliert und die Anwesenheit der gewünschten Mutation durch eine DNA-Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde *B. subtilis* mit den daraus entstandenen Plasmiden (Tabelle 16 und Tabelle 17) transformiert, wodurch sich diese über die homologen Bereiche des *amyE* Genlokus stabil ins Genom integrieren konnten. Die Integration wurde durch einen Amylase-Test (Material Methoden Abschnitt 5.2) überprüft. Die daraus resultierenden Stämme sind Tabelle 16 und Tabelle 17 zu entnehmen.

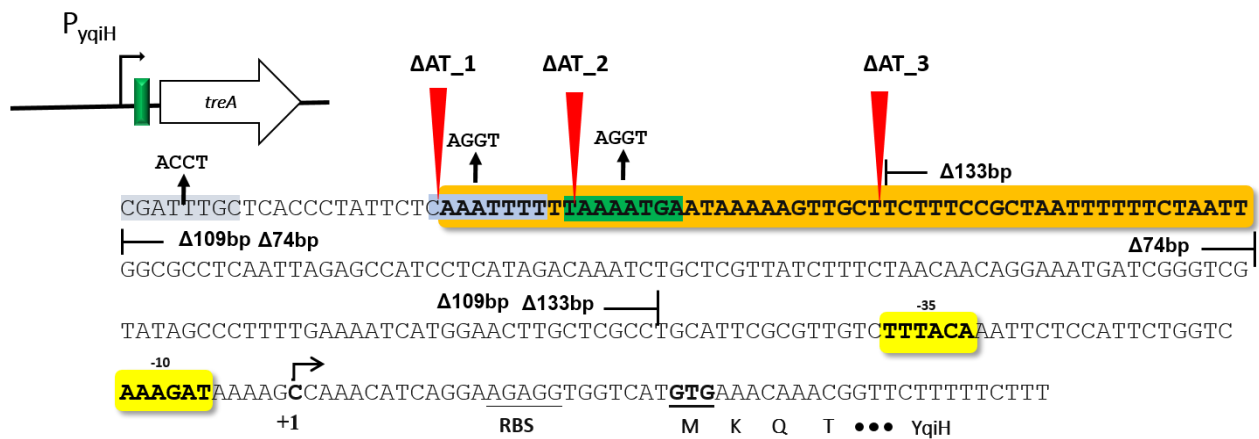


Abb. 44: Promotorbereich von *yqiH*

Darstellung des intergenen Bereiches mit einer Länge von 300 bp, der vor das Reportergen *treA* kloniert wurde. Eingezeichnet sind die verschiedenen Mutationen der putativen Bindestelle (Pfeile nach oben mit GG oder CC), die putativen Bindestellen (graue und grüne Kästen), die Promotorverkürzungen (rote Pfeile nach unten) und die Deletion des Bereiches (Endpunkt-Markierung mit $\Delta 74$ bp, $\Delta 109$ bp und $\Delta 133$ bp) zwischen der AT-reichen Region (oranger Kasten) und der -35 Region des *SigA*-Promotors (gelbe Kästen). Weiterhin ist der Transkriptionsstart gezeigt (+1), sowie die Ribosomenbindestelle (RBS) und die ersten Codons des *yqiH* Gens.

Tabelle 16: Mutationen des *yqiH* Promotors

Mutation	Plasmid	Allel Nummer	Wildtyp	$\Delta(degSU)$	<i>degU32</i> (Hy)	<i>degS200</i> (Hy)
Mutationen der putativen DegU~P Binde-Seiten (BS)						
1.BS	pSL25	21	SLB75	SLB182	SLB83	SLB267
2.BS	pSL26	22	SLB76	SLB183	SLB84	SLB268
3.BS	pSL42	23	SLB195	SLB196	SLB197	SLB271
1. und 2. BS	pSL44	24	SLB198	SLB199	SLB200	SLB272
1. und 3. BS	pSL43	25	SLB220	SLB276	SLB277	SLB278
2. und 3. BS	pSL27	26	SLB152	SLB165	SLB166	SLB270
1., 2. und 3. BS	pSL29	27	SLB144	SLB163	SLB164	SLB269
Verkürzung der AT-reichen Region						
ΔAT_1 (279bp)	pKF36		SLB54	SLB60	SLB57	-

Δ AT_2 (270bp)	pKF37		SLB55	SLB61	SLB58	-
Δ AT_3 (250bp)	pKF38		SLB56	SLB62	SLB59	-
Deletion der intergenen Region						
Δ 133bp	pSL54	28	SLB295	SLB296	SLB297	SLB298
Δ 109bp	pSL53	29	SLB291	SLB292	SLB293	SLB294
Δ 74bp	pSL52	30	SLB287	SLB288	SLB289	SLB290
Mutationen im SigA-Promotor						
yqiH Promotor: -35 TTTACA -16 GT -10 AAAGAT						
SigA Consensus: -35 TTGACA -16 TG -10 TATAAT						
-35 (TTTACA → TTGACA)	pKF18		KFB24	SLB36	SLB42	-
-16 (GT → TG)	pKF19		KFB25	SLB26	SLB43	SLB202
-10 (AAAGAT → AAAAAT)	pKF20		KFB26	SLB37	SLB44	-
Perfekte - 10	pKF25		KFB32	SLB38	SLB45	-
-10 invariantes T (AAAGAT → AAAGAG)	pKF24		KFB33	SLB39	SLB46	SLB286
Perfekte - 35 und -10	pKF27		KFB34	SLB27	SLB47	-
Perfekter SigA- Promotor	pKF26		KFB35	SLB28	SLB48	-



Abb. 45: Promotorbereich von *degU*

Darstellung des intergenen Bereiches von *degU*, der an das Reportergen *treA* fusioniert wurde. Eingezeichnet ist die Lage des *SigA*-Promotors (gelbe Kästen). Weiterhin ist der Transkriptionsstart gezeigt (+1), sowie die Ribosomenbindestelle (RBS) und die ersten Codons des *degU* Gens.

Tabelle 17: Mutationen der *SigA*-Promotoren von *degU*

Mutation	Plasmid	Wildtyp	$\Delta(degSU)$	<i>degU32</i> (Hy)	<i>degS200</i> (Hy)
Wildtyp Promotor	pTH17	THB417	THB217	THB317	-
Inaktivierung des P2 Promotors (-10 TATTAT → TATGGG)	pSL39	SLB189	SLB190	SLB191	SLB213
Inaktivierung des P3 Promotors (-10 AACAAAT → AACGGG)	pSL40	SLB186	SLB187	SLB188	SLB212

3.1.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzanalysen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (DNA Sequencing Service, Ebersberg, D) durchgeführt. Mit den DNA-Sequenzierungen wurden Plasmide auf das korrekte Insert überprüft oder zielgerichtete Mutagenesen kontrolliert. Eine Analyse der erhaltenen DNA-Sequenz erfolgte anschließend mit Hilfe des Programms Ape-A plasmid Editor v2.0.47

3.2 RNA Techniken

Für alle Arbeiten mit RNA wurde DEPC versetztes Wasser genutzt. Dafür wurde 1 ml DEPC auf 1000 ml ddH₂O gegeben, geschüttelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Wasser autoklaviert. So konnte gewährleistet werden, dass die folgenden Schritte RNase frei durchgeführt werden können.

3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *B. subtilis*

B. subtilis Kulturen wurden in Minimal-Medium bis zu einer OD₅₇₈ von 1,5 bis 1,8 inkubiert. Im Anschluss daran wurden 10 ml dieser Kulturen mit 5 ml eiskaltem „Killingpuffer“ (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM

MgCl₂; 20 mM NaN₃; mit DEPC-Wasser (1 %) auf 1000 ml aufgefüllt) versetzt und zur Ernte bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (116). Das Pellet wurde bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

Die eigentliche Isolation der Gesamt-RNA erfolgte nach dem Protokoll der Firma Peqlab mit TriFast, welches einer optimierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode entspricht. Die Extraktion basiert auf dem Prinzip der sauren Phenol Methode (QUELLE, Ambulos, 1978).

Hierfür wurde das Pellet in 1 ml TriFast Lösung (peqGOLD TriFast) resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Danach erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform und einer Mikro-Spatelspitze Glaskügelchen (d 0,1 mm). Der Zellaufschluss erfolgte mit dem Precellys-Homogenisator (peqlab) bei 3 x 20 sec 6500 rpm mit jeweils 15 sek Pause. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erfolgte eine Phasentrennung bei 13000 rpm für 5min. Zum Schluss wurde die obere Phase mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol für 10min auf Eis inkubiert und danach für 60 Minuten bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert um die RNA zu fällen. Das hierbei entstandene Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert. Das entstandene getrocknete Pellet wurde in 50 µl DEPC H₂O resuspendiert und die Konzentration mit dem Nanodrop bestimmt. Die Qualitätsprüfung erfolgte auf einem 1% Agarosegel, welches mit MOPS Puffer (Puffer Zusammensetzung siehe Material und Methoden Abschnitt 3.2.3) angesetzt wurde und auch in MOPS laufen gelassen wurde. Hierfür wurden 2 µg der isolierten DNA mit 2x Denaturierungsmix (65% Formamid, 4,4% Formaldehyd, 2x MOPS Puffer, 2% Sucrose, 2 mg/ml Bromphenolblau) gemischt und für 10 Minuten bei 70 °C denaturiert. Danach wurden die Proben direkt auf Eis abgekühlt und anschließend auf das MOPS-Agarosegel geladen. Die Elektrophorese erfolgte unter denselben Bedingungen wie unter 3.1.5 beschrieben. Nach der Visualisierung waren zwei klare Banden, die der 16s und 23s rRNA auf dem Gel zu erkennen.

3.2.2 Synthese von Digoxigenin- markierten RNA Sonden

Digoxigenin markierte RNA Sonden wurden durch *in vitro* Transkription nach dem Protokoll von Roche hergestellt. Die DNA Matrize wurde über PCR mit spezifischen Primern generiert. Hierbei wurde dem „Rückwärts“ Primer die Sequenz des T7 Promotors so angehängt, dass eine Antisense-RNA transkribiert wird. Die PCR Fragmente wurden auf ihre Qualität und Größe mittels eines Agarosegels kontrolliert. Die eigentliche Markierung der Sonden erfolgte über die Inkoooperation von digoxigenin-11-UTP nach Hersteller Angaben (Roche, Mannheim). Nach der Synthese der Antisense RNA Sonden wurde die restliche Matrizen DNA durch einen DNase I Verdau entfernt, diese Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,2 M EDTA gestoppt. Die Sonden wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Qualität der Markierung wurde getestet in dem die Sonden in einer Verdünnungsreihe (1:10, 1:200 und 1:2000) auf eine Nylon-Membran (Amersham, GE Healthcare) gespottet wurden und wie in Sektion 4.3.4 detektiert. Als Kontrolle wurde eine bereits DIG-markierte Sonde (DIG-labeled Control RNA, Roche) auf dieselbe Weise verdünnt und auf die Membran gespottet. Kurz zusammengefasst, wurden die Sonden nach dem Spotten auf der Membran fixiert (UV Stratalinker 1200), mit 1x MS Puffer gewaschen, mit 1 % Blocking-Lösung geblockt (30 Minuten, Raumtemperatur) und anschließend mit Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragments (Roche) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei binden die Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente an die DIG Sonden. Danach wurde die Membran zweimal mit 1x MS

Puffer gewaschen und anschließend in 10 mM Tris-HCl Puffer um gepuffert. Danach erfolgte die Detektion der Spots mit ECF. Das Anti-Digoxigenin-AP-Fab Fragment der Firma Roche enthält eine Alkaline Phosphatase, die in der Lage ist ECF zu dephosphorylieren, wodurch an der Stelle der Katalyse ein Fluoreszenz Produkt entsteht, welches dann mit der GelDocEZ Anlage (BioRad) detektiert werden kann.

3.2.3 Northern Blot Analyse

Das Expressionsmuster von spezifischen Genen wurde mittels Northern Blot auf mRNA Ebene analysiert. Hierbei konnte auch die Größe dieses mRNA Transkripts bestimmt werden.

Zunächst wurden hierfür 10 µg Gesamt-RNA mit gleichem Volumen 2x Denaturierungsmix gemischt und für 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Gleichzeitig wurden 3 µl peqGOLD High Range RNA-Leiter (peqlab, VWR) mit 3 µl 2x Denaturierungsmix gemischt und auch bei 70 °C für 10 Minuten gekocht. Die Proben wurden nach dem Denaturieren direkt auf Eis abgekühlt und im Anschluss auf ein 1,2 % MOPS-Formaldehyd-Agarosegel geladen. Die RNA wurde bei 70V 4 Stunden in 1x MOPS Puffer laufen gelassen. Danach wurde das Gel wie in Abb. 46 gezeigt aufgebaut. Dabei wurden alle Lagen unter dem Agarosegel in 20x SSC Puffer equilibriert und alle Lagen über dem Gel und das Gel selbst in 10xSSC equilibriert. Die Membran (Hybond N+, Amersham Bioscience) wurde auch in 20x SSC equilibriert. Der eigentliche Transfer erfolgte mittels Druck, durch ein Gewicht auf dem Blot, über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dem Transfer wurde die RNA durch UV Licht fixiert (Stratalinker, Stratagene). Um den Größenstandard sichtbar zu machen wurde er mit Methylenblau angefärbt.

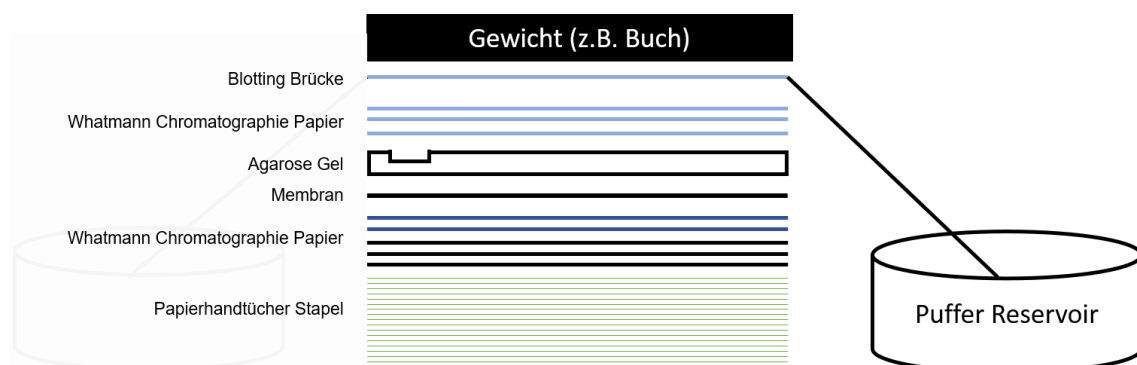


Abb. 46: Aufbau des Kapillar-Transfers des Northern Blots

Gezeigt ist der Aufbau des über Nacht Transfers der RNA auf eine Nylon-Membran. Das schwarz dargestellte Chromatographie Papier ist trocken, das dunkle blaue wurde in 10x SSC eingeweicht und das hell blaue in 20x SSC. Das Puffer Reservoir wurde mit 10x SSC für den Transfer befüllt und auf beiden Seiten des Blots aufgebaut.

Die Membran wurde nun in ein Hybridisierungsröhrchen platziert und für circa 4 Stunden bei 68 °C prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte unter Zugabe der DIG-markierten RNA Sonde zu frischer Hybridisierungslösung. Dafür wurde die Sonde für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und dann zu 10 ml Hybridisierungslösung gegeben, welche anschließend auf die Membran gegeben wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran folgendermaßen behandelt:

„Low Stringency Wash“: 2x 5 Minuten in 50 ml 2x SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur

“High Stringency Wash”: 3x 15 Minuten in 50 ml 0,1x SSC, 0, 1% SDS bei 68 °C

Alle Nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur vorgenommen

Equilibrieren: 1x 5 Minuten in 30 ml 1x MS Puffer

Blocken: 1x 60 Minuten in 30 ml 1xMS Puffer mit 1% Blocking Lösung

Antikörper: 1x 30 Minuten in 10 ml 1x MS Puffer mit 1% Blocking Lösung und 1 µl Alkaline Phosphatase konjugierte Anti-Digoxigenin Fab Fragmente (Roche, Mannheim)

Waschen: 2x 30 Minuten in 100 ml 1xMS Puffer mit 0,3 % Tween-20

Equilibrieren: 10 Minuten in 30 ml 10 mM Tris-HCl, pH 9,5.

Die RNA wurde mit circa 1 ml ECF (Amersham Bioscience) als Substrat und der GelDoc EZ Anlage visualisiert und fotografiert.

1X MOPS Puffer: 20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7.0

10X SSC: 1.5 M NaCl, 0.15 M Natriumacetat

Methylene blue dye: 0.1% (w/v) Methyleneblau, 300 mM Natriumacetat, pH 5.6

Hybridisierungslösung: 50% Formamid, 5X SSC, 0.1% N-Lauroylsarcosinate, 0.02% SDS, 2% Blocking Lösung (Roche, Mannheim)

4 Konstruktion von Bakterienstämmen und Plasmiden

In Tabelle im Kapitel Material und Methoden sind die Plasmide aufgelistet, die im Verlauf dieser Arbeit konstruiert wurden. Diesen Plasmiden liegen drei verschiedene Ausgangsvektoren zugrunde. Diese werden im Folgenden beschrieben sowie schematisch dargestellt. Mit Hilfe dieser Plasmide wurden wiederum zahlreiche *B. subtilis* Stämme (Tabelle 9) konstruiert. Durch Sequenzierungsreaktionen wurden alle konstruierten Plasmide überprüft.

4.1 Konstruktion von Plasmiden

4.1.1 Optimierung des Reporter-gen-Plasmids pJMB1

Der Vektor pJMB1 (M. Jebbar und E. Bremer, unveröffentlichte Daten) ist ein Derivat des Vektors pMD476 (283) und ermöglicht die Herstellung einer N-terminalen *treA*-Reporter-gen-fusion in *B. subtilis* (Abbildung 10). Das *treA* Gen kodiert in *B. subtilis* für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glukosidase (TreA) (103, 123) und wird aufgrund dieser Eigenschaft bevorzugt in *B. subtilis* zu Reporter-gen-studien von osmotisch induzierbaren Genen eingesetzt. Das Plasmid pJMB1 besitzt eine *Bam*HI-*Sma*I „multiple cloning site“ zur Integration der diversen Promotorregionen. Jedoch überlappen die beiden Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen. Mit Hilfe des „Site directed mutagenesis Kit“ der Firma Agilent (LaJolla, USA) wurden die Erkennungssequenzen optimiert und noch ein 2 bp Spacer zwischen die Sequenzen eingefügt, sodass die Linearisierung des Plasmids vereinfacht wurde (Entstehung des Plasmids pPink).

Verschiedene Promotorregionen wurden von der chromosomalen DNA des *B. subtilis* 168 Wildtyps mittels PCR amplifiziert. Sowohl die PCR-Amplifikate, als auch der Vektor pPink, wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Bam*HI verdaut, der Vektor noch dephosphoryliert und anschließend mit dem Insert ligiert. Der Vektor pPink besitzt als zusätzliche Besonderheit zwei Sequenzbereiche, die homolog zu dem *amyE* Genlokus aus *B. subtilis* sind, sodass eine stabile Integration ins Chromosom möglich ist. Das *amyE* Gen kodiert in *B. subtilis* für die α -Amylase (305) und ist nicht essentiell.

Alle konstruierten Stämme sind in Tabelle 18 aufgelistet

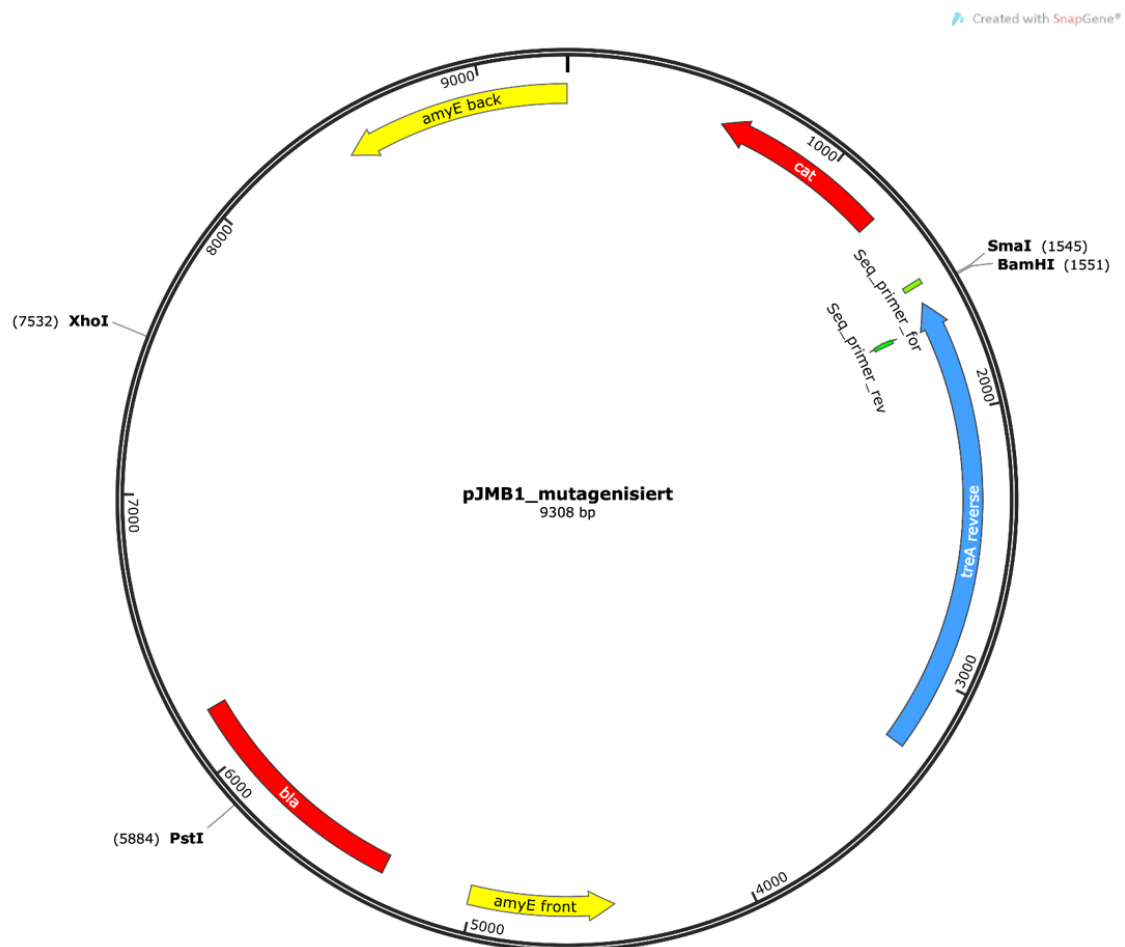


Abb. 47: Plasmid-Karte des mutagenisierten pJMB1 (pPink)

Gezeigt sind die Antibiotika Resistenzkassetten für Chloramphenicol (*cat*, rot) und Ampicillin (*bla*, blass rot) für die Selektion in *B. subtilis* und *E. coli*. Außerdem sind in Grün die Homologen Bereiche des *amyE* Lokus dargestellt, sowie das Reportergen *treA* (blau). Die Sequenzierungsprimer zur korrekten Klonierung sind in grün dargestellt. Die zur Klonierung und Transformation benötigten Schnittstellen sind eingezeichnet.

Tabelle 18: pJMB1 Derivate und die daraus resultierenden *B. subtilis* Stämme

Gene	Fragmentlänge	Plasmid	Wildtyp	$\Delta(degSU)$	<i>degU32</i> (Hy)	<i>degS200</i> (Hy)
<i>yqiH</i>	300 bp	pKF13	KFB41	KFB72	KFB78	SLB160
<i>degS</i>	421 bp	pTH1	THB41	THB21	THB31	SLB214
<i>degUP₂</i>	454 bp	pSL40	SLB186	SLB187	SLB188	SLB212
<i>degUP₃</i>	454 bp	pSL39	SLB189	SLB190	SLB191	SLB213
<i>yukE</i>	560 bp	pSL32	SLB155	SLB172	SLB173	SLB203
<i>yfjA</i>	376 bp	pSL34	SLB156	SLB174	SLB175	SLB208
<i>mpr</i>	513 bp	pSL33	SLB157	SLB176	SLB177	SLB209
<i>ycdA</i>	370 bp	pSL37	SLB233	SLB234	SLB235	SLB236
<i>yfkN</i>	285 bp	pSL45	SLB241	SLB242	SLB243	SLB244
<i>ispA</i>	222 bp	pSL41	SLB192	SLB193	SLB194	SLB211
<i>rapG</i>	186 bp	pSL2	SLB132	SLB135	SLB136	SLB206
<i>phrG</i>	379 bp	pSL1	SLB131	SLB133	SLB134	SLB205
<i>phrG</i>	550 bp	pSL55	SLB299	SLB300	SLB301	SLB302
<i>ywqH</i>	429 bp	pSL36	SLB154	SLB170	SLB171	SLB207
<i>yjhA</i>	216 bp	pSL35	SLB158	SLB178	SLB179	SLB210
<i>yqxI</i>	789 bp	pTH15	THB415	THB215	THB315	SLB204
<i>yddT</i>	437 bp	pTH10	THB410	THB210	THB310	SLB215
<i>yitP</i>	425 bp	pTH12	THB412	THB212	THB312	SLB216
<i>yomL</i>	315 bp	pTH14	THB414	THB214	THB314	SLB217
<i>sacB</i>	510 bp	pSL19	SLB221	SLB222	SLB223	SLB224
<i>aprE</i>	477 bp	pSL20	SLB225	SLB226	SLB227	SLB228
<i>ywsC</i>	777 bp	pSL21	SLB229	SLB230	SLB231	SLB232
<i>yvpB</i>	282 bp	pSL38	SLB237	SLB238	SLB239	SLB240
<i>xynD</i>	650 bp	pSL46	SLB245	SLB246	SLB247	SLB248
<i>proH</i>	153 bp	pJSB35	SLB253	SLB254	SLB255	SLB256
<i>opuA</i>	976 bp	pMBB10	SLB257	SLB258	SLB259	SLB260
<i>yral</i>	476 bp	pSL48	SLB263	SLB264	SLB265	SLB266

4.1.2 Das Plasmid pGP1331

Das Plasmid pGP1331 ist ein integratives Plasmid um ein Gen mit einem 3x FLAG-Tag am C-terminalen Ende zu versehen. Das Plasmid basiert auf dem Plasmid pUS19, enthält den 3 FLAG-Tag aus dem Plasmid pAL-FLAG-rsIW und keinen *B. subtilis ori*. (185). Bei der Integration des Plasmids in das

Chromosom von *B. subtilis* 168 bleibt die Expression des Gens unter seinem natürlichen Promotor. Um die Proteine YqiH, YqiI, YqiK und AprE mit einem 3x FLAG-Tag zu versehen wurden die letzten 600bp (beziehungsweise 200bp von yqiH) des entsprechenden Gens per PCR amplifiziert und der Vektor sowie die PCR Fragmente mit *EcoRI* und *Sall* (*yqiH*, *yqiK* und *aprE*) oder mit *Sall* und *PstI* (*yqiI*) geschnitten. Der Vektor wurde danach dephosphoryliert und im Anschluss mit den PCR-Fragmenten ligiert. Die Plasmide wurden nach erfolgreicher Kontroll-Sequenzierung in *B. subtilis* zirkulär transformiert. Dadurch ist zu beachten, dass bei allen Experimenten ein Selektionsdruck aufrechterhalten werden muss, da auf dem Chromosom noch homologe Bereiche vorhanden sind, die ein „raus loopen“ des Plasmids ermöglichen. Die korrekte Insertion ins Chromosom wurde durch eine PCR und den Vergleich mit dem Ausgangsstamm kontrolliert.

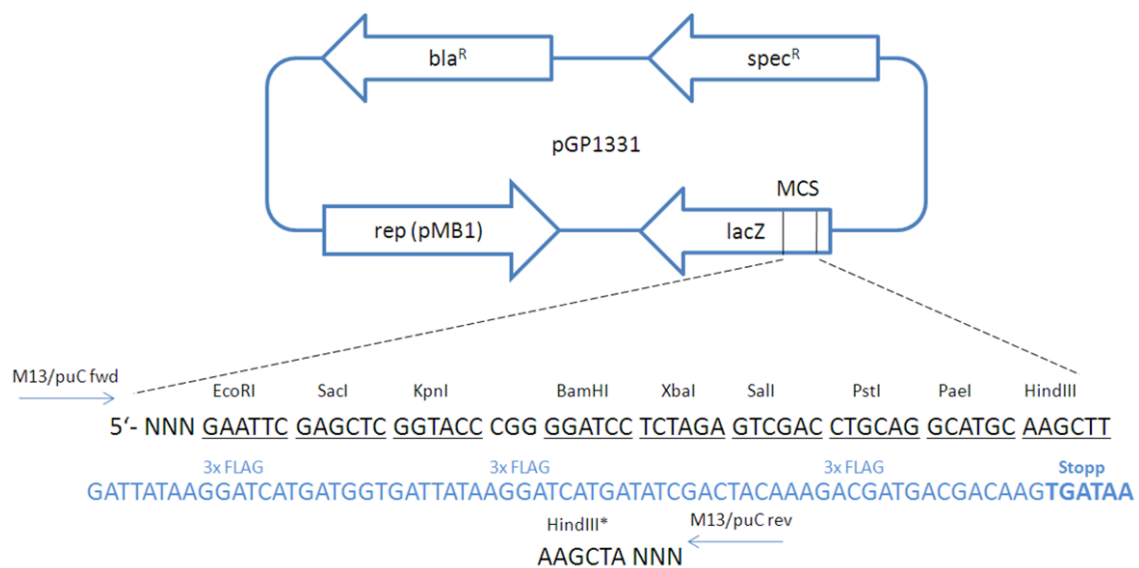


Abb. 48: Schematische Darstellung von pGP1331 (185)

Dargestellt ist die „multiple cloning site“ mit den möglichen Restriktionsschnittstellen zur Klonierung, sowie Sequenz des 3x FLAG-Tags. Außerdem zeigt das Plasmid die Antibiotika Resistenzkassetten für Ampicillin (*bla*, Selektion in *E. coli*) und für Spectinomycin (*spec*, Selektion in *B. subtilis*). Des Weiteren liegt die „multiple cloning site“ im *lacZ* Gen, sodass eine Selektion in *E. coli* über den sogenannten Blau-Weiß Screen möglich ist (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/wiki/index.php/PGP1331>)

4.2 Konstruktion von Bakterienstämmen

4.2.1 Konstruktion von Deletion-Insertions-Mutanten

Während dieser Arbeit wurden 3 verschiedene Deletion -Insertions Mutanten konstruiert. Dabei wurden zum einen das RapG-PhrG System, sowie PhrG auch einzeln deletiert. Durch diese Deletionen sollte der Einfluss des RapG-PhrG Systems auf die Regulation von DegU analysiert werden. Zur Untersuchung der physiologischen Rolle des salzinduzierten T7SS wurde dieses im Rahmen dieser Arbeit deletiert. Die Deletion der Gene erfolgte über die Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette nach der Methode von Kuwayama *et al.* (182). Das RapG-PhrG System wurde dabei durch eine Tetracyclin Kassette ersetzt und das T7SS wurde durch eine Zeocin Kassette ersetzt. Die mittels PCR amplifizierten Konstrukte (Abbildung 7) wurden durch doppelt homologe Rekombination in das Chromosom des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes 168 am ursprünglichen Genort inseriert. Die Rekombinanten wurden über spezifische

Antibiotika-Agarplatten (siehe Resistenzen) selektioniert. Sämtliche entstanden *B. subtilis* Deletionsmutanten wurden durch eine PCR-Reaktion auf die korrekte Lokalisation der Antibiotika-Resistenzkassetten im *B. subtilis* Genom hin überprüft und sind in Tabelle 3 beschrieben.

4.2.2 Konstruktion diverserer Reporter-gen-Fusionsstämmen

Die Konstruktion der diversen *treA*-Reporter-gen-stämme (Tabelle 18) basiert auf der Integration des Plasmides pPINK (pJMB1 Derivat; M. Jebbar und E. Bremer, unveröffentlichte Daten) in das Genom von *B. subtilis* über den *amyE* Genlokus. Dafür wurden zunächst alle konstruierten pPink Derivate (Tabelle 18) mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *PstI* (Abb. 47) linearisiert und im Anschluss daran benutzt um *B. subtilis* zu transformieren. Der Empfängerstamm besaß eine chromosomale *treA* Gendeletion, damit die gemessene TreA-Aktivität allein der Promotoraktivität des Fusionskonstruktes zugeordnet werden konnte. Dafür wurde ein *B. subtilis* $\Delta treA$ Stamm verwendet (SLB63) (Tabelle 9). Durch homologe Sequenzbereiche zum *amyE* Lokus aus *B. subtilis*, konnte das linearisierte Plasmid über doppelt homologe Rekombination ins Genom des Akzeptorstammes inseriert werden. Die korrekte Insertion wurde schließlich über den AmyE Phänotyp auf Stärkeplatten mittels eines Iod-Testes bestimmt (70). Um den Einfluss diverser Regulatoren aus *B. subtilis* auf die *yqiHIK* Promotoraktivität und auf die des *yukE* Operons (T7SS) zu testen, wurden die korrespondierenden Wildtyp-Fusionsstämmen KFB41 und SLB155 (Tabelle 9 und Tabelle 10) mit chromosomaler DNA der jeweiligen Regulatormutanten (Tabelle 9) transformiert. Anschließend erfolgte die Selektion auf spezifische Antibiotika. Die daraus entstandenen Stämme sowie die korrespondierenden Plasmide sind der Tabelle zu entnehmen.

4.2.3 Konstruktion von *degU32(Hy)* und *degS200(Hy)* Stämmen

Um den Einfluss des Zwei-Komponenten Systems DegS-DegU sowohl auf *yqiHIK*, wie auch auf andere Promotoren zu testen wurden zwei verschiedene sogenannte Hypermутanten verwendet. Hierbei handelt es sich um Punktmutationen im *degS* [*degS200(Hy)*] oder *degU* [*degU32(Hy)*] Gen die zu einer erhöhten Exoproteaseaktivität führen (siehe Material und Methoden Abschnitt 3.2). Die Mutanten haben keine inserierte Antibiotika-Kontrolle, sondern sind an eine Antibiotika Resistenzkassette gekoppelt. Dadurch war nach erfolgreicher Selektion auf die jeweiligen Antibiotika noch ein weiterer Nachweis nötig, dass auch die Mutationen mit transformiert wurden. Auf Grund der erhöhten Exoproteaseaktivität war es möglich mit Magermilch-Platten auf diesen Phänotyp zu screenen (siehe Material und Methoden Abschnitt 5.3).

5 Biochemische Methoden

5.1 Bestimmung der TreA-Aktivität

Die enzymatische Aktivität von TreA (Phospho- α -(1,1)-Glukosidase) kann durch einen kolorimetrischen Test nachgewiesen werden und wurde somit genutzt um die Promotor Aktivitäten verschiedener Gene nachzuweisen. Die Glukosidase spaltet Trehalose – 6- Phosphat in Glukose und Glukose – 6- Phosphat, es kann aber auch das chromogene Substrat pNPG (para-Nitrophenyl- α -Glucopyranosid) *in vitro* spalten. Dieses Substrat kann mit Hilfe des TreA Enzyms umgesetzt werden, wobei ein Reaktionsprodukt eine gelbe Färbung besitzt (123, 165). Diese Färbung ist photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm

quantifizierbar und ein Maß für den Expressionsniveau des jeweiligen Fusionskonstruktes. In den folgenden Experimenten wurde *treA* als Reportergen verwendet, da es eine höhere Stabilität unter hochosmolaren Bedingungen aufweist, als das übliche Reportergen *lacZ*. Zur Bestimmung der TreA-Aktivität der verschiedenen Reporterstämme (Tabelle 3) wurden diese entweder in Minimalmedium oder in Minimalmedium mit diversen osmotischen Substanzen bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} $1,5 \pm 0,2$) kultiviert und im Anschluss daran aliquotiert (1,8 ml). Die Proben wurden daraufhin pelletiert (13000rpm, 5Minuten, Raumtemperatur; für Proben in HMM ohne Salz mussten die Proben viermal 5 Minuten zentrifugiert werden um ein Pellet zu erhalten) sowie in 0,5 ml Z-Puffer resuspendiert (216). Zur Hydrolyse der Zellwand wurde Lysozym verwendet (1 mg/ml). Nach 10-minütiger Inkubation (37°C) wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (13000rpm, 5min, Raumtemperatur) entfernt. 400µl des Überstands wurden mit 400µl Z-Puffer gemischt. Die eigentliche Reaktion wurde durch die Zugabe von 200µl pNPG gestartet und so lange bei 28°C im Wasserbad inkubiert bis eine Gelbfärbung eintrat, maximal jedoch 3 Stunden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,5ml Na_2CO_3 gestoppt. Die exakte Start- und Stoppzeit wurde notiert. Danach wurden die Proben im Photometer bei einer Wellenlänge von 420nm gemessen und die TreA-Aktivität mit der folgenden Formel berechnet:

$$A_{TreA} = 1500 * E_{420} / (OD_{578} * V * \Delta t * 0.8)$$

A_{TreA} : Spezifische TreA-Aktivität ($nmol * min^{-1} * mg^{-1}$ = Einheit pro mg Protein)

E_{420} : Absorption des gespaltenen o-Nitrophenol

OD_{578} : OD bei Ernte der Kulturen

V: Volumen das in den Assay eingesetzt wurde (0,4ml)

Δt : Reaktionszeit (von der Zugabe von pNPG bis zur Zugabe von Na_2CO_3)

5.2 Amylase Test

Die oben beschriebenen *treA* Reportergenfusionen wurden nach Transformation des linearisierten Plasmids mittels homologer Rekombination in den *amyE* Locus von *B. subtilis* integriert. Dabei wurde nicht nur die richtige Antibiotikaresistenz kontrolliert, sondern auch auf einen amylasenegativen Phänotyp Selektioniert. Dafür wurden die möglichen korrekten Stämme auf 1% Stärke Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen von der Platte gekratzt und auf eine neue LB Agarplatte überstrichen. Anschließend wurde die Stärke Platte mit einer Kaliumjodid Lösung (0,5% Jod (w/v) und 1% Kaliumiodide (w/v) überschüttet, dabei wird die Stärke in der Platte dunkel lila angefärbt. Durch Anwesenheit der Amylase AmyE ist *B. subtilis* in der Lage Stärke hydrolytisch zu spalten, wodurch die Stärke in der LB Agar Platte in Glukose gespalten wird und keine lila Färbung durch Kaliumiodid stattfindet. Ist die entsprechende *B. subtilis* Kolonie amyE- sollte kein heller Lysehof zu erkennen sein, sondern der Agar färbt sich dunkel violett um diese Kolonie.

5.3 Exoprotease Assay

Wie oben bereits beschrieben wurde der Hypermutanten Phänotyp auf Magermilch Platten selektioniert. Hierbei wurden LB Agar Platten mit 2% (w/v) Magermilchpulver versetzt. Für den Test wurde LB Medium

mit einer frischen *B. subtilis* Kolonie, die den Hypermutanten Phänotyp tragen sollte, angeimpft und bis zur exponentiellen Phase wachsen gelassen ($OD\ 1,5 \pm 0,2$), diese wurde anschließend auf eine OD von 0,1 verdünnt und 10 µl wurden auf eine Magermilch Platte getropft. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde immer der Ausgangsstamm verwendet. Nach der Inkubation war, wenn die Transformation der Hypermutante erfolgreich war, ein deutlicher Unterschied zwischen Ausgangsstamm und Hypermutante sichtbar, da diese in der Lage ist Proteine im Milchpulver zu spalten, sodass ein deutlich größerer Lysehof bei der Hypermutante zu detektieren war.

5.4 Bestimmung des Prolin-Pools

Die Quantifizierung von Prolin erfolgte nach der von Bates *et al.* beschriebenen sauren Ninhydrin-Methode (23). α -Aminosäuren (mit primären Amino-Gruppen) reagieren mit Ninhydrin bei sauren pH unter Bildung eines Farbstoffes, der blaviolett bis rotbraun gefärbt ist. Bei Aminosäuren mit sekundären Amino-Gruppen läuft die Reaktion nur teilweise ab, so bildet Prolin mit Ninhydrin einen gelben Farbstoff. Die Extinktion des Prolinderivates kann dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 480 nm gemessen werden. Dabei ist die Intensität der Farbe der Konzentration des Farbstoffes und damit der Konzentration von Prolin proportional (Lambert Beersches Gesetz).

Für den Test wurden die zu untersuchenden Stämme bis zu einer OD_{578} von 1,8-2 angezogen. Anschließend wurden 10 ml Bakterienkultur abzentrifugiert (8 min, 5.000 rpm, 20 °C), der Überstand verworfen und das Pellet bis zur Ernte aller Kulturen bei -20 °C eingefroren. Das Pellet wurde in 900 µl SSA-Lösung resuspendiert und die Zellen über Nacht bei Raumtemperatur unter starkem Schütteln (750 rpm) aufgeschlossen. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurden die Proben zentrifugiert (15 min, 13.000 rpm) und der erhaltene Überstand (Zellextrakt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dem Zellextrakt wurden 500 µl entnommen, mit 500 µl Ninhydrin-Lösung und 500 µl Eisessig versetzt und für 1 h im Wasserbad (100 °C) gekocht. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Danach wurde 2 ml Toluol zugegeben, die Proben für 30 sek gründlich gevortext und nach anschließender Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm) wurde das farbige Endprodukt in die Toluolphase extrahiert. Die Extinktion des roten Prolin-Ninhydrin-Farbkomplexes in der Toluolphase wurde gegen Toluol als Blindwert bei 480 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung von L-Prolin erfolgte unter Verwendung einer Kalibrationsgeraden (0 – 8 mM L-Prolin).

$$\frac{900\mu\text{l SSA}}{OD_{578} * 0,65 * 10} * \frac{E_{420}}{\epsilon (\text{Steigung der Kalibrationsgerade}) * 10}$$

Lösungen zur Quantifizierung von Prolin

SSA-Lösung: 3 % (wt/vol) 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat

Ninhydrin-Lösung: 1,25 g Ninhydrin

30 ml Eisessig

20 ml 6 M Phosphorsäure

5.5 Ermittlung der Proteinkonzentration

Die Protein Konzentration wurde photometrisch mit dem NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) nach der Herstelleranleitung bestimmt.

5.6 Produktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen

5.6.1 Heterologe Überexpression in *E. coli*

Für die Überproduktion des Proteins DegS wurde der *E. coli* BL21 – pOFX-tac Stamm genutzt. Dieser besitzt das Plasmid pOFXtac-SL2, welches für die Gene *groES* und *groEL* kodiert, die unter einem IPTG induzierbaren Ptac Promotor exprimiert werden. Diese Gene kodieren für Chaperone die bei der Proteinfaltung helfen. Der degS Leserahmen befindet sich auf Plasmid pTH3, welches ein Derivat des pASK-IBA3 Vektors ist. Das unterliegt der Kontrolle eines Anhydrotetracyclin induzierbaren Promotors. Darüber hinaus ermöglichen die Vektoren durch die Fusion eines C-terminalen Strep-Tags an die synthetisierten Proteine, eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie, basierend auf der Bindung der Fusionsproteine an ein spezifisches Säulenmaterial. Für die heterologe Produktion von DegS wurde der BL21 – pOFX-tac Stamm mit den Vektoren pTH3 transformiert und über Nacht auf LB-Ampicillin/Chloramphenicol Agarplatten selektioniert. Mit Hilfe dieser Transformanten wurde eine Vorkultur beimpft. Für die Expression wurde LB Medium mit Ampicillin verwendet. Das Volumen der Vorkultur betrug 250 ml, die Inkubation erfolgte bei 220 rpm und einer Temperatur von 37°C über Nacht. Das Beimpfen der Hauptkultur (Volumen 1l) auf eine OD₅₇₈ von 0,1 erfolgte mit Hilfe der Vorkultur. Die resultierenden Stämme wurden in 1 Liter LB Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol bei 30°C bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD₅₇₈ von 0,5) inkubiert. Die Induktion der Promotoren erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG und 200 µl/L AHT. Nach 2 Stunden (OD ~0,9) wurden die Zellen geerntet (4°C, 5000 rpm) und bei -20°C bis zur Weiternutzung gelagert.

Für die heterologe Produktion von DegU wurde der *E. coli* BL21 Stamm mit dem Plasmid pTH4 transformiert und die Inkubation erfolgte wie für DegS beschrieben, außer dass die Zugabe von Chloramphenicol und IPTG wegfiel. DegU wurde auch C-Terminal mit einem Strep-Tag versehen.

Zur Überprüfung, ob die Induktion und somit die Produktion der rekombinanten Proteine erfolgreich war, wurden vor Induktion sowie vor der Ernte, Proben entnommen. Die Analyse der Aliquots erfolgte unter Berücksichtigung der OD₅₇₈ über eine SDSPAGE.

5.6.2 Reinigung der Proteine DegS und DegU via Strep-Tag Affinitätschromatographie

Nach der Überproduktion von DegS und DegU wurden die gefrorenen Zellpellets auf Eis aufgetaut und anschließend in 10-15ml Puffer W resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über dreimaligen Aufschluss über die French Press (French® Pressure Cell Press; American Instrument Company, Silver Spring, USA). Die Zelltrümmer und Membranen wurden mittels Ultrazentrifugation (60 min; 30.000 rpm; 4°C) entfernt. Der Überstand wurde anschließend über einen Loop auf eine Strep-Tactin Sepharose Säule (IBA, Göttingen) aufgetragen. Bei der für die Proteinreinigung verwendeten Anlage handelt es sich um eine ÄKTAbasic der Firma GE Healthcare Europe (München, D). Die Steuerung der Anlage erfolgte über die dazugehörige Unicorn-Software.

Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen von Puffer W (Waschpuffer) equilibriert. Die Chromatographie erfolgte bei 4°C mit einer Flussrate von 1ml/min. Die Säule wurde weiter mit 24 Volumenteilen von Puffer W gewaschen und das Fusionsprotein mittels 30 ml Puffer E eluiert. Die Eluate wurden in 5 ml Fraktionen gesammelt und auf einem SDS –Gel auf die Reinheit überprüft. Nach der Analyse der einzelnen Fraktionen wurden diejenigen, mit der höchsten Proteinkonzentration durch Zentrifugation über eine

Membran mit Hilfe eines Zentrifugationskessels (Vivaspin 6; Volumen 6 ml; Sartorius AG, Göttingen, D) ankonzentriert. Die Ausschlussgröße der Membran lag bei 10 kDa. Die Proteinkonzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt und die Proteine wurden für die anschließende Gelfiltration genutzt.

Buffer W: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

Buffer E: Puffer W mit 2.5 mM Desthiobiotin

5.6.3 Gel Filtration Analyse

Zur Untersuchung auf Aggregate und Bestimmung der nativen Größe von DegU wurde eine Gelfiltrationschromatographie mit dem gereinigten Protein durchgeführt. Verwendet wurden die Säule HiLoad Superdex 200pg, die an die Äkta pure (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) angeschlossen waren. Vor dem Auftragen von 1-2 mg Protein, wurde die verwendete Säule zuvor mit Waschpuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) equilibriert.

5.7 SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen

Die SDS-Gelelektrophorese (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid) wurde zur Überprüfung des Zellaufschlusses von *B. subtilis* Kulturen verwendet, sowie zur Kontrolle der Menge, die an Zellextrakt aufgetragen wurde. Die SDS-PAGE wurde nach Standardprotokollen (183) ausgeführt, wobei die Gel-Läufe in Elektrophorese-Kammern von Bio-Rad durchgeführt worden sind. Als Standard und zur Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine, wurde der Page Ruler Prestained Protein Marker (Thermo Fisher Scientific Inc. Life Science, St. Leon-Rot, D) verwendet (10-170kDa). Im Detail wurden die Proben in SDS-Probenpuffer (60mM Tris-HCl pH6, 8, 2%SDS, 6% Glycerin, 0,005% Bromphenolblau, 5mM EDTA, 0,1M DTT) resuspendiert und für 5-10Minuten bei 95°C im Thermomixer denaturiert, danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 5-15µl der Proben auf ein 13%iges SDS-Gel (Zusammensetzung siehe Tabelle 19) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 25mA bis die Bromphenollaufbande das untere Gel-Ende erreicht. Als Elektrodenpuffer diente TGS-Puffer (25 mM Tris/HCl pH 8,8; 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS). Das SDS Gel wurde nun entweder für einen Western Blot weiterverwendet oder mit einer Coomassie Färbelösung angefärbt. Hierfür wurde die InstantBlue Lösung von Expedeon (Expedeon Inc, USA) benutzt, das Gel wurde für eine Stunde in der Lösung gefärbt und anschließend durch einscannen dokumentiert.

Tabelle 19: Zusammensetzung von einem 13% SDS Agarosegel

Trenngel		Sammelgel	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
Acrylamid (37:1)	3,25 ml	Acrylamid (37:1)	1 ml
H ₂ O	4,25 ml	H ₂ O	6,5 ml
TEMED	7 µl	TEMED	7 µl
10% APS	60 µl	10% APS	60 µl

5.8 Fraktionierung von *B. subtilis*

Die Zellpellets wurden in Z-Puffer resuspendiert (Formel: $x \text{ (ml)} = \text{geerntete ml} \cdot \text{OD}_{578} \cdot 13,3$) mit 60 μl Lysozym (20mg/ml) lysiert und mit 3xSDS-Probenpuffer beladen. Die Proteinproben wurden für 10 Minuten bei 95 °C im Thermocycler gekocht und für 10 Minuten bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Ein 13 %iges SDS-Gel wurde mit 10 μl der Probe beladen und die Proteine wurden elektrophoretisch getrennt.

Um sekretierte Proteine zu isolieren wurden 100ml Kulturen bis zu einer $\text{OD}_{578} 1,5 \pm 0,2$ wachsen gelassen. Um Protease Aktivität zu vermindern wurden den Zellen 1,5mM EDTA und 0,1mM PMFS zugefügt, für 10 Minuten weiter bei 37°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand wurde über einen 0,22 μm Sterilfilter filtriert um eventuell nicht pelletierte Zellen zu entfernen. Um die Proteinkonzentration zu erhöhen wurde der Überstand mit TCA gefällt. Hierfür wurde 100% TCA zu dem Überstand mit einer Endkonzentration von 15% gegeben und über Nacht bei 4°C gefällt. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 10000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 30ml Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde nochmal mit 70% Ethanol gewaschen und das Pellet letztendlich in maximal 100 μl SDS-Ladepuffer aufgenommen.

5.9 Western Blot Analyse

Der Western Blot diente der Lokalisation der YqiH, YqiI und YqiK Proteine. Dafür wurden die drei Proteine mit einem FLAG-Tag markiert und mit der degU32(Hy) Mutante kombiniert um ein erhöhtes Expressionsniveau zu erreichen. Die Stämme, sowie die Kontrolle (AprE-FLAG) wurden in 200ml SMM-1,2M NaCl angezogen und geerntet. Die Proben wurden, wie unter Punkt 6.6 „Fraktionierung“ beschrieben, aufgearbeitet und dann auf ein SDS Gel geladen. Das SDS-Gel wurde nach der Auftrennung auf eine Nylon Membran (Millipore) geblottet (100V, 1Stunde) und über Nacht in 5% Blocking-Lösung (Zusammensetzung siehe unten) geschwenkt. Die Immunodetektion erfolgte nach folgenden Schritten:

1. Blot 2 x 5 Minuten in TTBS waschen und 1x 15 Minuten in TTBS waschen
2. Blot 2 Stunden mit ersten Antikörper unter leichten schwenken inkubieren: Dafür wird der Antikörper 1:2500 in 2% TTBSM verdünnt (4 μl /10ml TTBSM)
3. Blot 1x15 Minuten in TTBS waschen und 2x 5 Minuten in TTBS waschen
4. Blot 1 Stunde mit dem zweiten Antikörper unter leichten schwenken inkubieren. Dafür wird der Antikörper 1:7500 in 2 % TTBSM (1,3 μl / 10 ml TTBSM) verdünnt.
5. Blot 1x 5 Minuten in TTBS waschen
6. Blot in 100 mM Tris-HCl pH 9 equilibrieren

Die in Tris Puffer equilibrierte Nylon Transfer Membran wird mit dem Substrat ECL (Amersham Bioscience, Glattbrugg, Schweiz) benetzt. Der sekundäre Antikörper enthält eine Alkaline Phosphatase, die in der Lage ist da ECL zu dephosphorylieren, wodurch an der Stelle der Katalyse ein Lumineszenz Produkt entsteht, welches dann mit der Intas Kamera (Intas) detektiert werden kann.

Erster Antikörper: Anti-FLAG Antikörper produziert im Hase (F7425) (Sigma Aldrich, Steinheim)

Zweiter Antikörper: Donkey Anti-Rabbit IgG, Alkaline Phosphatase (Promega, Mannheim)

Zusammensetzung:

TTBS: 20mM TrisHCl pH 7,5

150mM NaCl

0,05% Tween20

TTBS-M: TTBS + 5% Magermilchpulver

VII Literaturverzeichnis

1. **Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmek BJ, Bitter W.** 2007. Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:883-91.
2. **Aertsen A, Michiels CW.** 2004. Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**:263-73.
3. **Aguilar C, Vlamakis H, Losick R, Kolter R.** 2007. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:638-43.
4. **Aiba H, Nakasai F, Mizushima S, Mizuno T.** 1989. Evidence for the physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**:14090-4.
5. **Alice AF, Sanchez-Rivas C.** 1997. DNA supercoiling and osmoresistance in *Bacillus subtilis* 168. *Curr. Microbiol.* **35**:309-15.
6. **Amati G, Bisicchia P, Galizzi A.** 2004. DegU-P represses expression of the motility fla-che operon in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **186**:6003-14.
7. **Antelmann H, Darmon E, Noone D, Veening JW, Westers H, Bron S, Kuipers OP, Devine KM, Hecker M, van Dijk JM.** 2003. The extracellular proteome of *Bacillus subtilis* under secretion stress conditions. *Mol. Microbiol.* **49**:143-56.
8. **Antelmann H, Scharf C, Hecker M.** 2000. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J. Bacteriol.* **182**:4478-90.
9. **Antelmann H, Tjalsma H, Voigt B, Ohlmeier S, Bron S, van Dijk JM, Hecker M.** 2001. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res.* **11**:1484-502.
10. **Appleby JL, Bourret RB.** 1998. Proposed signal transduction role for conserved CheY residue Thr87, a member of the response regulator active-site quintet. *J. Bacteriol.* **180**:3563-9.
11. **Atrih A, Foster SJ.** 1999. The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**:299-307.
12. **Auchtung JM, Lee CA, Grossman AD.** 2006. Modulation of the ComA-dependent quorum response in *Bacillus subtilis* by multiple Rap proteins and Phr peptides. *J. Bacteriol.* **188**:5273-85.
13. **Aymerich S, Gonzytreboul G, Steinmetz M.** 1986. 5'-noncoding region SacR is the target of all identified regulation affecting the levansucrase gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **166**:993-8.
14. **Baba T, Schneewind O.** 1998. Targeting of muralytic enzymes to the cell division site of Gram-positive bacteria: repeat domains direct autolysin to the equatorial surface ring of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* **17**:4639-46.
15. **Bachmann BJ.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-97.
16. **Bai Y, Yang J, Zarrella TM, Zhang Y, Metzger DW, Bai G.** 2014. Cyclic di-AMP impairs potassium uptake mediated by a cyclic di-AMP binding protein in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **196**:614-23.
17. **Baichoo N, Wang T, Ye R, Helmann JD.** 2002. Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol. Microbiol.* **45**:1613-29.
18. **Baldus JM, Buckner CM, Moran CP, Jr.** 1995. Evidence that the transcriptional activator Spo0A interacts with two sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **17**:281-90.
19. **Baptista C, Barreto HC, Sao-Jose C.** 2013. High levels of DegU-P activate an Esat-6-Like secretion system in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* **8**:e67840.
20. **Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Medigue C, Danchin A.** 2009. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology.* **155**:1758-75.
21. **Bashir A, Hoffmann T, Kempf B, Xie X, Smits SH, Bremer E.** 2014. Plant-derived compatible solutes proline betaine and betonidine confer enhanced osmotic and temperature stress tolerance to *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* **160**:2283-94.
22. **Bashir A, Hoffmann T, Smits SH, Bremer E.** 2014. Dimethylglycine provides salt and temperature stress protection to *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:2773-85.
23. **Bates LS, Waldren RP, Teare ID.** 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* **39**:205-7.

24. **Bernhardt J, Völker U, Völker A, Antelmann H, Schmid R, Mach H, Hecker M.** 1997. Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*--a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology*. **143**:999-1017.
25. **Bernhardt TG, de Boer PAJ.** 2003. The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol. Microbiol.* **48**:1171-82.
26. **Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B.** 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*. **144** (Pt 11):3195-203.
27. **Birnboim HC, Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-23.
28. **Boch J, Kempf B, Bremer E.** 1994. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J. Bacteriol.* **176**:5364-71.
29. **Bohlool BB.** 1975. Occurrence of *Sulfolobus-Acidocaldarius*, an Extremely Thermophilic Acidophilic Bacterium, in New-Zealand Hot Springs - Isolation and Immunofluorescence Characterization. *Arch. Microbiol.* **106**:171-4.
30. **Bolard J.** 1986. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta.* **864**:257-304.
31. **Boos W, Shuman H.** 1998. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:204-29.
32. **Booth IR.** 2014. Bacterial mechanosensitive channels: progress towards an understanding of their roles in cell physiology. *Curr. Opin. Microbiol.* **18**:16-22.
33. **Booth IR, Miller S, Müller A, Lehtovirta-Morley L.** 2015. The evolution of bacterial mechanosensitive channels. *Cell Calcium* **57**:140-50.
34. **Bourot S, Sire O, Trautwetter A, Touze T, Wu LF, Blanco C, Bernard T.** 2000. Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**:1050-6.
35. **Brack C, Mikolasch A, Schlueter R, Otto A, Becher D, Wegner U, Albrecht D, Riedel K, Schauer F.** 2015. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Mar. Biotechnol. (NY)* **17**:290-304.
36. **Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R.** 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol. Microbiol.* **59**:1229-38.
37. **Branda SS, Gonzalez-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R.** 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:11621-6.
38. **Bremer E.** 2001. Adaptation to changing osmolarity, p 385-91. In Sonnenschein AL, Losick, R. M. and Hoch, J. A. (ed), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, American Society for Microbiology. ASM Press, Washington D. C.
39. **Bremer E, Kraemer R.** 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes, p 79-97. In Storz G, Hengge-Aronis R (ed), *Bacterial stress response*, ASM Press.
40. **Brigulla M, Hoffmann T, Krisp A, Völker A, Bremer E, Völker U.** 2003. Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J. Bacteriol.* **185**:4305-14.
41. **Brill J, Hoffmann T, Bleisteiner M, Bremer E.** 2011. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *J. Bacteriol.* **193**:5335-46.
42. **Britton RA, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Fawcett P, Monson R, Losick R, Grossman AD.** 2002. Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (σ^H) regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184**:4881-90.
43. **Brown AD.** 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**:803-46.
44. **Broy S, Chen C, Hoffmann T, Brock NL, Nau-Wagner G, Jebbar M, Smits SH, Dickschat JS, Bremer E.** 2015. Abiotic stress protection by ecologically abundant dimethylsulfoniopropionate and its natural and synthetic derivatives: insights from *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* **17**:2362-78.
45. **Brzoska P, Boos W.** 1989. The *ugp*-encoded glycerophosphoryldiester phosphodiesterase, a transport-related enzyme of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **5**:115-24.
46. **Brzostek K, Raczowska A, Zasada A.** 2003. The osmotic regulator OmpR is involved in the response of *Yersinia enterocolitica* O : 9 to environmental stresses and survival within macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**:265-71.

47. **Burts ML, DeDent AC, Missiakas DM.** 2008. EsaC substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **69**:736-46.
48. **Burts ML, Williams WA, DeBord K, Missiakas DM.** 2005. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:1169-74.
49. **Cagliero C, Jin DJ.** 2013. Dissociation and re-association of RNA polymerase with DNA during osmotic stress response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **41**:315-26.
50. **Cai YH, Huang H.** 2012. Advances in the study of protein-DNA interaction. *Amino Acids* **43**:1141-6.
51. **Cairns LS, Hobley L, Stanley-Wall NR.** 2014. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol. Microbiol.* **93**:587-98.
52. **Cairns LS, Marlow VL, Bissett E, Ostrowski A, Stanley-Wall NR.** 2013. A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **90**:6-21.
53. **Cairns LS, Martyn JE, Bromley K, Stanley-Wall NR.** 2015. An alternate route to phosphorylating DegU of *Bacillus subtilis* using acetyl phosphate. *BMC Microbiol.* **15**:78.
54. **Calamita G, Bishai WR, Preston GM, Guggino WB, Agre P.** 1995. Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**:29063-6.
55. **Calvio C, Celandroni F, Ghelardi E, Amati G, Salvetti S, Cecilian F, Galizzi A, Senesi S.** 2005. Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *J. Bacteriol.* **187**:5356-66.
56. **Candela T, Fouet A.** 2006. Poly-g-glutamate in bacteria. *Mol. Microbiol.* **60**:1091-8.
57. **Castanie MP, Berges H, Oreglia J, Prere MF, Fayet O.** 1997. A set of pBR322-compatible plasmids allowing the testing of chaperone-assisted folding of proteins overexpressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem.* **254**:150-2.
58. **Cayley S, Record MT, Jr.** 2003. Roles of cytoplasmic osmolytes, water, and crowding in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress: biophysical basis of osmoprotection by glycine betaine. *Biochemistry* **42**:12596-609.
59. **Chai Y, Kolter R, Losick R.** 2009. Paralogous antirepressors acting on the master regulator for biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **74**:876-87.
60. **Chater K, Nikaido H.** 1999. Cell regulation: maintaining integrity and efficiency in microbial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:121-25.
61. **Chen L, James LP, Helmann JD.** 1993. Metalloregulation in *Bacillus subtilis* - Isolation and characterization of 2 genes differentially repressed by metal-ions. *J. Bacteriol.* **175**:5428-37.
62. **Chu F, Kearns DB, Branda SS, Kolter R, Losick R.** 2006. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **59**:1216-28.
63. **Chu F, Kearns DB, McLoon A, Chai Y, Kolter R, Losick R.** 2008. A novel regulatory protein governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **68**:1117-27.
64. **Claverys JP, Havarstein LS.** 2007. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'etre. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:219-29.
65. **Commichau FM, Wacker I, Schleider J, Blencke HM, Reif I, Tripal P, Stulke J.** 2007. Characterization of *Bacillus subtilis* mutants with carbon source-independent glutamate biosynthesis. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **12**:106-13.
66. **Coros A, Callahan B, Battaglioli E, Derbyshire KM.** 2008. The specialized secretory apparatus ESX-1 is essential for DNA transfer in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **69**:794-808.
67. **Corrigan RM, Grundling A.** 2013. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**:513-24.
68. **Courey AJ, Plon SE, Wang JC.** 1986. The use of psoralen-modified DNA to probe the mechanism of enhancer action. *Cell* **45**:567-74.
69. **Csonka LN.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**:121-47.
70. **Cutting S, Vander HP.** 1990. Genetic analysis, p 27–74. In Harwood C, Cutting S (ed), *Molecular biological methods for Bacillus*. Chichester, United Kingdom, John Wiley & Sons, Inc.
71. **Dahl MK, Msadek T, Kunst F, Rapoport G.** 1991. Mutational analysis of the *Bacillus subtilis* DegU regulator and its phosphorylation by the DegS protein kinase. *J. Bacteriol.* **173**:2539-47.

72. **Dahl MK, Msadek T, Kunst F, Rapoport G.** 1992. The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **267**:14509-14.
73. **Dartois V, Debarbouille M, Kunst F, Rapoport G.** 1998. Characterization of a novel member of the DegS-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**:1855-61.
74. **Davidson FA, Seon-Yi C, Stanley-Wall NR.** 2012. Selective heterogeneity in exoprotease production by *Bacillus subtilis*. *PLoS One* **7**:e38574.
75. **de Boer WR, Meyer PD, Jordens CG, Kruyssen FJ, Wouters JT.** 1982. Cell wall turnover in growing and nongrowing cultures of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **149**:977-84.
76. **Devi SN, Vishnoi M, Kiehler B, Haggett L, Fujita M.** 2015. In vivo functional characterization of the transmembrane histidine kinase KinC in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* **161**:1092-104.
77. **Dmitriev BA, Toukach FV, Schaper KJ, Holst O, Rietschel ET, Ehlers S.** 2003. Tertiary structure of bacterial murein: the scaffold model. *J. Bacteriol.* **185**:3458-68.
78. **Do TH, Suzuki Y, Abe N, Kaneko J, Itoh Y, Kimura K.** 2011. Mutations suppressing the loss of DegQ function in *Bacillus subtilis* (natto) poly- γ -glutamate synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:8249-58.
79. **Dubnau D.** 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **55**:395-424.
80. **Dubnau D, Losick R.** 2006. Bistability in bacteria. *Mol. Microbiol.* **61**:564-72.
81. **Dubnau D, Provvedi R.** 2000. Internalizing DNA. *Res. Microbiol.* **151**:475-80.
82. **Egger LA, Park H, Inouye M.** 1997. Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells.* **2**:167-84.
83. **Fabret C, Feher VA, Hoch JA.** 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* **181**:1975-83.
84. **Fawcett P, Eichenberger P, Losick R, Youngman P.** 2000. The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:8063-8.
85. **Ferrari E, Henner DJ, Perego M, Hoch JA.** 1988. Transcription of *Bacillus subtilis* subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants. *J. Bacteriol.* **170**:289-95.
86. **Fischer KE.** 2012. Eine neue Facette im zellulären Anpassungsprozess von *Bacillus subtilis* an hohe Salinitäten: Die Analyse des osmotisch induzierten *yqiHIK* Operons. Philipps Universität Marburg.
87. **Fischer KE, Bremer E.** 2012. Activity of the osmotically regulated *yqiHIK* promoter from *Bacillus subtilis* is controlled at a distance. *J. Bacteriol.* **194**:5197-208.
88. **Fisher MT.** 2006. Proline to the rescue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:13265-6.
89. **Fleming HP, Ordal ZJ.** 1964. Responses of *Bacillus subtilis* spores to ionic environments during sporulation and germination. *J. Bacteriol.* **88**:1529-37.
90. **Foster SJ, Popham DL.** 2002. Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers, and capsules, p 21-41. In Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (ed), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: From genes to cells. ASM Press, Washington, D.C.
91. **Frees D, Savijoki K, Varmanen P, Ingmer H.** 2007. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **63**:1285-95.
92. **Fujisawa M, Wada Y, Ito M.** 2004. Modulation of the K⁺ efflux activity of *Bacillus subtilis* YhaU by YhaT and the C-terminal region of YhaS. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**:211-7.
93. **Fujita M, Gonzalez-Pastor JE, Losick R.** 2005. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187**:1357-68.
94. **Fukuda M, Watanabe S, Kaneko J, Itoh Y, Kamio Y.** 2009. The membrane lipoprotein LppX of *Paenibacillus* sp. strain W-61 serves as a molecular chaperone for xylanase of glycoside hydrolase family 11 during secretion across the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **191**:1641-9.
95. **Fyans JK, Bignell D, Loria R, Toth I, Palmer T.** 2013. The ESX/type VII secretion system modulates development, but not virulence, of the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Mol. Plant. Pathol.* **14**:119-30.
96. **Galinski EA, Truper HG.** 1994. Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**:95-108.
97. **Galperin MY.** 2010. Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**:150-9.

98. **Garufi G, Butler E, Missiakas D.** 2008. ESAT-6-like protein secretion in *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. **190**:7004-11.
99. **Gaur NK, Oppenheim J, Smith I.** 1991. The *Bacillus subtilis sin* gene, a regulator of alternate developmental processes, codes for a DNA-binding protein. J. Bacteriol. **173**:678-86.
100. **Ghuysen J-M, Tripper DJ, Strominger JL.** 1966. Enzymes that degrade bacterial cell walls. Methods Enzymol. **8**:685-99.
101. **Gonzalez-Pastor JE, Hobbs EC, Losick R.** 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. Science **301**:510-3.
102. **Gorke B, Stulke J.** 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. Nat. Rev. Microbiol. **6**:613-24.
103. **Gotsche S, Dahl MK.** 1995. Purification and characterization of the phospho- α -(1,1)glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. J. Bacteriol. **177**:2721-6.
104. **Grebe TW, Stock JB.** 1999. The histidine protein kinase superfamily. Adv. Microb. Physiol. **41**:139-227.
105. **Grossman AD.** 1995. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. Annu. Rev. Genet. **29**:477-508.
106. **Guerout-Fleury AM, Frandsen N, Stragier P.** 1996. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. Gene **180**:57-61.
107. **Gupta M, Rao KK.** 2014. Phosphorylation of DegU is essential for activation of *amyE* expression in *Bacillus subtilis*. J. Biosci. **39**:747-52.
108. **Guttenplan SB, Kearns DB.** 2013. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. FEMS Microbiol. Rev.
109. **Guttenplan SB, Shaw S, Kearns DB.** 2013. The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **87**:211-29.
110. **Hadzhieva T.** 2007. Transcriptional activation and sensing properties of DegS-DegU: a two-component system involved in the osmotic regulation of *Bacillus subtilis*. Philipps-Universität Marburg.
111. **Hamon MA, Lazazzera BA.** 2001. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **42**:1199-209.
112. **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**:557-80.
113. **Harrison SC, Aggarwal AK.** 1990. DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. Annu. Rev. Biochem. **59**:933-69.
114. **Hartig E, Jahn D.** 2012. Regulation of the anaerobic metabolism in *Bacillus subtilis*. Adv. Microb. Physiol. **61**:195-216.
115. **Harwood C, Archibald A.** 1990. Growth, maintenance and general techniques, p 1–26. In CR H, SM C (ed), Molecular biological methods for Bacillus. Chichester, United Kingdom, John Wiley & Sons.
116. **Hauser NC, Vingron M, Scheideler M, Krems B, Hellmuth K, Entian KD, Hoheisel JD.** 1998. Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **14**:1209-21.
117. **Hayhurst EJ, Kailas L, Hobbs JK, Foster SJ.** 2008. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**:14603-8.
118. **Hayzer DJ, Leisinger T.** 1980. The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. **118**:287-93.
119. **Hecker M, Pane-Farre J, Völker U.** 2007. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **61**:215-36.
120. **Hecker M, Schumann W, Völker U.** 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **19**:417-28.
121. **Hecker M, Völker U.** 1998. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the s^B regulon. Mol. Microbiol. **29**:1129-36.
122. **Hefti MH, Francoijs KJ, de Vries SC, Dixon R, Vervoort J.** 2004. The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. Eur. J. Biochem. **271**:1198-208.
123. **Helfert C, Gotsche S, Dahl MK.** 1995. Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus-Subtilis* is catalyzed by a phospho- α -(1-1)-glucosidase encoded by the *treA* gene. Mol. Microbiol. **16**:111-20.

124. **Helmann JD.** 1995. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* σ^A -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**:2351-60.
125. **Hengge-Aronis R.** 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:148-52.
126. **Henner DJ, Ferrari E, Perego M, Hoch JA.** 1988. Location of the targets of the *hpr-97*, *sacU32(Hy)*, and *sacQ36(Hy)* mutations in upstream regions of the subtilisin promoter. *J. Bacteriol.* **170**:296-300.
127. **Henner DJ, Yang M, Ferrari E.** 1988. Localization of *Bacillus subtilis* *sacU(Hy)* mutations to two linked genes with similarities to the conserved procaryotic family of two-component signalling systems. *J. Bacteriol.* **170**:5102-9.
128. **Herbold DR, Glaser L.** 1975. Interaction of N-acetylmuramic acid L-alanine amidase with cell wall polymers. *J. Biol. Chem.* **250**:7231-8.
129. **Hezayen FF, Rehm BH, Tindall BJ, Steinbuchel A.** 2001. Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the *Archaea* from Egypt that produces extracellular poly(glutamic acid). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1133-42.
130. **Higgins CF, Dorman CJ, Stirling DA, Waddell L, Booth IR, May G, Bremer E.** 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**:569-84.
131. **Hirose I, Sano K, Shioda I, Kumano M, Nakamura K, Yamane K.** 2000. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology.* **146** (Pt 1):65-75.
132. **Hobley L, Ostrowski A, Rao FV, Bromley KM, Porter M, Prescott AR, MacPhee CE, van Aalten DM, Stanley-Wall NR.** 2013. BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**:13600-5.
133. **Hoffmann T, Bremer E.** 2011. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *J. Bacteriol.* **193**:1552-62.
134. **Hoffmann T, Wensing A, Brosius M, Steil L, Völker U, Bremer E.** 2013. Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *J. Bacteriol.* **195**:510-22.
135. **Hohmann S.** 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:300-72.
136. **Holtje JV.** 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:181-203.
137. **Holtmann G, Bakker EP, Uozumi N, Bremer E.** 2003. KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J. Bacteriol.* **185**:1289-98.
138. **Holtmann G, Bremer E.** 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J. Bacteriol.* **186**:1683-93.
139. **Holtmann G, Brigulla M, Steil L, Schutz A, Barnekow K, Völker U, Bremer E.** 2004. RsbV-independent induction of the σ^B -dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during growth at high temperature. *J. Bacteriol.* **186**:6150-8.
140. **Höper D, Bernhardt J, Hecker M.** 2006. Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. *Proteomics* **6**:1550-62.
141. **Höper D, Völker U, Hecker M.** 2005. Comprehensive characterization of the contribution of individual σ^B -dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187**:2810-26.
142. **Hsueh YH, Cozy LM, Sham LT, Calvo RA, Gutu AD, Winkler ME, Kearns DB.** 2011. DegU-phosphate activates expression of the anti-sigma factor FlgM in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **81**:1092-108.
143. **Huppert LA, Ramsdell TL, Chase MR, Sarracino DA, Fortune SM, Burton BM.** 2014. The ESX system in *Bacillus subtilis* mediates protein secretion. *PLoS One* **9**:e96267.
144. **Huynh PL, Jankovic I, Schnell NF, Bruckner R.** 2000. Characterization of an HPr kinase mutant of *Staphylococcus xylosus*. *J. Bacteriol.* **182**:1895-902.

145. **Ignatova Z, Gierasch LM.** 2006. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:13357-61.
146. **Ishii H, Tanaka T, Ogura M.** 2013. The *Bacillus subtilis* response regulator gene *degU* is positively regulated by CcpA and by catabolite-repressed synthesis of ClpC. *J. Bacteriol.* **195**:193-201.
147. **Ishikawa S, Kawahara S, Sekiguchi J.** 1999. Cloning and expression of two autolysin genes, *cwlU* and *cwlV*, which are tandemly arranged on the chromosome of *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*. *Mol. Gen. Genet.* **262**:738-48.
148. **Ivanova EP, Vysotskii MV, Svetashev VI, Nedashkovskaya OI, Gorshkova NM, Mikhailov VV, Yumoto N, Shigeri Y, Taguchi T, Yoshikawa S.** 1999. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Int. Microbiol.* **2**:267-71.
149. **Jacobs C, Huang LJ, Bartowsky E, Normark S, Park JT.** 1994. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for β -lactamase induction. *EMBO J.* **13**:4684-94.
150. **Jenal U, Hengge-Aronis R.** 2003. Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:163-72.
151. **Jensen RB, Wang SC, Shapiro L.** 2002. Dynamic localization of proteins and DNA during a bacterial cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**:167-76.
152. **Jers C, Kobir A, Sondergaard EO, Jensen PR, Mijakovic I.** 2011. *Bacillus subtilis* two-component system sensory kinase DegS is regulated by serine phosphorylation in its input domain. *PLoS One* **6**:e14653.
153. **Jiang M, Shao WL, Perego M, Hoch JA.** 2000. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **38**:535-42.
154. **Jovanovich SB, Martinell M, Record MT, Jr., Burgess RR.** 1988. Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **170**:534-9.
155. **Kaeriyama M, Machida K, Kitakaze A, Wang H, Lao Q, Fukamachi T, Saito H, Kobayashi H.** 2006. OmpC and OmpF are required for growth under hyperosmotic stress above pH 8 in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**:195-201.
156. **Kallio PT, Fagelson JE, Hoch JA, Strauch MA.** 1991. The transition state regulator Hpr of *Bacillus subtilis* is a DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **266**:13411-7.
157. **Kandler O, König H, Wiegel J, Claus D.** 1983. Occurrence of Poly-g-D-Glutamic Acid and Poly-a-L-Glutamine in the Genera *Xanthobacter*, *Flexithrix*, *Sporosarcina* and *Planococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**:34-41.
158. **Kappes RM, Kempf B, Bremer E.** 1996. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J. Bacteriol.* **178**:5071-9.
159. **Kappes RM, Kempf B, Kneip S, Boch J, Gade J, Meier-Wagner J, Bremer E.** 1999. Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **32**:203-16.
160. **Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R.** 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **55**:739-49.
161. **Kearns DB, Chu F, Rudner R, Losick R.** 2004. Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Mol. Microbiol.* **52**:357-69.
162. **Keener J, Kustu S.** 1988. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:4976-80.
163. **Kempf B, Bremer E.** 1995. OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**:16701-13.
164. **Kempf B, Bremer E.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**:319-30.
165. **Kennett RH, Sueoka N.** 1971. Gene expression during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. The relationship between gene order on the chromosome and temporal sequence of enzyme synthesis. *J. Mol. Biol.* **60**:31-44.
166. **Kimura K, Tran LS, Uchida I, Itoh Y.** 2004. Characterization of *Bacillus subtilis* g-glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly-g-glutamate. *Microbiology.* **150**:4115-23.

167. **Kobayashi K.** 2007. Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **66**:395-409.
168. **Kobayashi K.** 2008. SlrR/SlrA controls the initiation of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **69**:1399-410.
169. **Kobayashi K.** 2015. Plant methyl salicylate induces defense responses in the rhizobacterium *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* **17**:1365-76.
170. **Kobayashi K, Kuwana R, Takamatsu H.** 2008. *kinA* mRNA is missing a stop codon in the undomesticated *Bacillus subtilis* strain ATCC 6051. *Microbiology.* **154**:54-63.
171. **Koch AL, Doyle RJ.** 1985. Inside-to-outside growth and turnover of the wall of gram-positive rods. *J. Theor. Biol.* **117**:137-57.
172. **Kohlstedt M, Sappa PK, Meyer H, Maass S, Zaprasis A, Hoffmann T, Becker J, Steil L, Hecker M, van Dijl JM, Lalk M, Mäder U, Stülke J, Bremer E, Völker U, Wittmann C.** 2014. Adaptation of *Bacillus subtilis* carbon core metabolism to simultaneous nutrient limitation and osmotic challenge: a multi-omics perspective. *Environ. Microbiol.* **16**:1898-917.
173. **Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jimenez H, Guazzaroni ME, Ramos JL.** 2010. Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**:539-59.
174. **Krispin O, Allmansberger R.** 1995. Changes in DNA supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**:129-35.
175. **Kroos L.** 2007. The *Bacillus* and *Myxococcus* developmental networks and their transcriptional regulators. *Annu. Rev. Genet.* **41**:13-39.
176. **Kuhlmann AU, Bremer E.** 2002. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:772-83.
177. **Kunst F, Debarbouille M, Msadek T, Young M, Mauel C, Karamata D, Klier A, Rapoport G, Dedonder R.** 1988. Deduced polypeptides encoded by the *Bacillus subtilis* *sacU* locus share homology with two-component sensor-regulator systems. *J. Bacteriol.* **170**:5093-101.
178. **Kunst F, Msadek T, Bignon J, Rapoport G.** 1994. The DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems are part of a network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* **145**:393-402.
179. **Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Cordani JJ, Connerton IF, Cummings NJ, Daniel RA, Denzot F, Devine KM, Dusterhoft A, Ehrlich SD, Emmerson PT, Entian KD, Errington J, Fabret C, Ferrari E, Foulger D, Fritz C, Fujita M, Fujita Y, Fuma S, Galizzi A, Galleron N, Ghim SY, Glaser P, Goffeau A, Golightly EJ, Grandi G, Guiseppi G, Guy BJ, Haga K, et al.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-56.
180. **Kunst F, Rapoport G.** 1995. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:2403-7.
181. **Kustu S, North AK, Weiss DS.** 1991. Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **16**:397-402.
182. **Kuwayama H, Obara S, Morio T, Katoh M, Urushihara H, Tanaka Y.** 2002. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res.* **30**:E2.
183. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
184. **Ledeaux JR, Yu NY, Grossman AD.** 1995. Different roles for KinA, KinB, and KinC in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:861-3.
185. **Lehnik-Habrink M, Pfortner H, Rempeters L, Pietack N, Herzberg C, Stulke J.** 2010. The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex. *Mol. Microbiol.* **77**:958-71.
186. **Lewis RJ, Brannigan JA, Offen WA, Smith I, Wilkinson AJ.** 1998. An evolutionary link between sporulation and prophage induction in the structure of a repressor:anti-repressor complex. *J. Mol. Biol.* **283**:907-12.
187. **Lewis RJ, Brannigan JA, Smith I, Wilkinson AJ.** 1996. Crystallisation of the *Bacillus subtilis* sporulation inhibitor SinR, complexed with its antagonist, SinI. *FEBS Lett.* **378**:98-100.

188. **Liebal UW, Sappa PK, Millat T, Steil L, Homuth G, Völker U, Wolkenhauer O.** 2012. Proteolysis of beta-galactosidase following s^B activation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Biosyst.* **8**:1806-14.
189. **Lin D, Qu LJ, Gu H, Chen Z.** 2001. A 3.1-kb genomic fragment of *Bacillus subtilis* encodes the protein inhibiting growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Appl. Microbiol.* **91**:1044-50.
190. **Litzinger S, Duckworth A, Nitzsche K, Risinger C, Wittmann V, Mayer C.** 2010. Muropeptide rescue in *Bacillus subtilis* involves sequential hydrolysis by beta-N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *J. Bacteriol.* **192**:3132-43.
191. **Lopez CS, Heras H, Garda H, Ruzal S, Sanchez-Rivas C, Rivas E.** 2000. Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress. *Int. J. Food. Microbiol.* **55**:137-42.
192. **Lopez CS, Heras H, Ruzal SM, Sanchez-Rivas C, Rivas EA.** 1998. Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium. *Curr. Microbiol.* **36**:55-61.
193. **Lopez D, Fischbach MA, Chu F, Losick R, Kolter R.** 2009. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:280-5.
194. **Lopez D, Kolter R.** 2010. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**:134-49.
195. **Lukat GS, Lee BH, Mottonen JM, Stock AM, Stock JB.** 1991. Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **266**:8348-54.
196. **Lukat GS, McCleary WR, Stock AM, Stock JB.** 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:718-22.
197. **Mäder U, Antelmann H, Buder T, Dahl MK, Hecker M, Homuth G.** 2002. *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Mol. Genet. Genomics* **268**:455-67.
198. **Magnuson R, Solomon J, Grossman AD.** 1994. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. *Cell* **77**:207-16.
199. **Makino K, Amemura M, Kim SK, Nakata A, Shinagawa H.** 1993. Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **7**:149-60.
200. **Mandal N, Su W, Haber R, Adhya S, Echols H.** 1990. DNA looping in cellular repression of transcription of the galactose operon. *Genes Dev.* **4**:410-8.
201. **Mariappan A, Makarewicz O, Chen XH, Borriess R.** 2012. Two-component response regulator DegU controls the expression of bacilysin in plant-growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **22**:114-25.
202. **Maris AE, Sawaya MR, Kaczor-Grzeskowiak M, Jarvis MR, Bearson SM, Kopka ML, Schroder I, Gunsalus RP, Dickerson RE.** 2002. Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator. *Nat. Struct. Biol.* **9**:771-8.
203. **Marles-Wright J, Lewis RJ.** 2007. Stress responses of bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**:755-60.
204. **Marlow VL, Cianfanelli FR, Porter M, Cairns LS, Dale JK, Stanley-Wall NR.** 2013. The prevalence and origin of exoprotease producing cells in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Microbiology.*
205. **Marlow VL, Porter M, Hobley L, Kiley TB, Swedlow JR, Davidson FA, Stanley-Wall NR.** 2014. Phosphorylated DegU manipulates cell fate differentiation in the *Bacillus subtilis* biofilm. *J. Bacteriol.* **196**:16-27.
206. **Marmur J, Doty P.** 1961. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J. Mol. Biol.* **3**:585-94.
207. **Marquez-Magana LM, Chamberlin MJ.** 1994. Characterization of the sD transcription unit of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**:2427-34.
208. **Martinez SE, Beavo JA, Hol WG.** 2002. GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Mol. Interv.* **2**:317-23.
209. **McCormick A, Jacobsen ID, Broniszewska M, Beck J, Heesemann J, Ebel F.** 2012. The two-component sensor kinase TcsC and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* **7**:e38262.

210. **McLean RJ, Beauchemin D, Clapham L, Beveridge TJ.** 1990. Metal-Binding Characteristics of the Gamma-Glutamyl Capsular Polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. Appl. Environ. Microbiol. **56**:3671-7.
211. **McLoon AL, Guttenplan SB, Kearns DB, Kolter R, Losick R.** 2011. Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. J. Bacteriol. **193**:2027-34.
212. **Mehne FM, Gunka K, Eilers H, Herzberg C, Kaever V, Stulke J.** 2013. Cyclic di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*: both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. J. Biol. Chem. **288**:2004-17.
213. **Meikle AJ, Reed RH, Gadd GM.** 1988. Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. **134**:3049-60.
214. **Meile JC, Wu LJ, Ehrlich SD, Errington J, Noirot P.** 2006. Systematic localisation of proteins fused to the green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: identification of new proteins at the DNA replication factory. Proteomics **6**:2135-46.
215. **Meroueh SO, Bencze KZ, Hesek D, Lee M, Fisher JF, Stemmler TL, Mobashery S.** 2006. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**:4404-9.
216. **Miller J.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory **Cold Spring Harbor, NY.**
217. **Miller KJ, Wood JM.** 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **50**:101-36.
218. **Mordini S, Osera C, Marini S, Scavone F, Bellazzi R, Galizzi A, Calvio C.** 2013. The role of SwrA, DegU and P-D3 in *fla/che* expression in *B. subtilis*. PLoS One **8**:e85065.
219. **Moreau P, Hen R, Wasyluk B, Everett R, Gaub MP, Chambon P.** 1981. The Sv40-72 base repair repeat has a striking effect on gene-expression both in Sv40 and other chimeric recombinants. Nucleic Acids Res. **9**:6047-68.
220. **Msadek T.** 1999. When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. Trends Microbiol. **7**:201-7.
221. **Msadek T, Kunst F, Henner D, Klier A, Rapoport G, Dedonder R.** 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. J. Bacteriol. **172**:824-34.
222. **Msadek T, Kunst F, Klier A, Rapoport G.** 1991. DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. J. Bacteriol. **173**:2366-77.
223. **Msadek T, Kunst F, Rapoport G.** 1995. A signal transduction network in *Bacillus subtilis* includes the DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems., p 447-71. In Hoch JA, Silhavy TJ (ed), Two-Component Signal Transduction. American Society for Microbiology, Washington, DC.
224. **Mukai K, Kawata-Mukai M, Tanaka T.** 1992. Stabilization of phosphorylated *Bacillus subtilis* DegU by DegR. J. Bacteriol. **174**:7954-62.
225. **Mukai K, Kawata M, Tanaka T.** 1990. Isolation and phosphorylation of the *Bacillus subtilis* *degS* and *degU* gene products. J. Biol. Chem. **265**:20000-20006.
226. **Nagler K, Setlow P, Li YQ, Moeller R.** 2014. High salinity alters the germination behavior of *Bacillus subtilis* spores with nutrient and nonnutrient germinants. Appl. Environ. Microbiol. **80**:1314-21.
227. **Nagorska K, Ostrowski A, Hine K, Holland IB, Obuchowski M.** 2010. Importance of *eps* genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. J. Appl. Microbiol. **51**:369-81.
228. **Nannapaneni P, Hertwig F, Depke M, Hecker M, Mader U, Volker U, Steil L, van Hijum SA.** 2012. Defining the structure of the general stress regulon of *Bacillus subtilis* using targeted microarray analysis and random forest classification. Microbiology. **158**:696-707.
229. **Nelson JW, Sudarsan N, Furukawa K, Weinberg Z, Wang JX, Breaker RR.** 2013. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. Nat. Chem. Biol. **9**:834-9.
230. **Nicolas P, Mäder U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich S, Becher D, Bisicchia P, Botella E, Delumeau O, Doherty G, Denham EL, Fogg MJ, Fromion V, Goelzer A, Hansen A, Hartig E, Harwood CR, Homuth G, Jarmer H, Jules M, Klipp E, Le Chat L, Lecoite F, Lewis P, Liebermeister W, March A, Mars RA, Nannapaneni P, Noone D, Pohl S, Rinn B, Rugheimer F, Sappa PK, Samson F, Schaffer M,**

- Schwikowski B, Steil L, Stulke J, Wiegert T, Devine KM, Wilkinson AJ, van Dijk JM, Hecker M, Völker U, Bessieres P, et al.** 2012. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* **335**:1103-6.
231. **Nikaido H, Vaara M.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32.
232. **O'Rourke SM, Herskowitz I, O'Shea EK.** 2002. Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet.* **18**:405-12.
233. **O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:49-79.
234. **Ogura M, Kawata-Mukai M, Itaya M, Takio K, Tanaka T.** 1994. Multiple copies of the *proB* gene enhance *degS*-dependent extracellular protease production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**:5673-80.
235. **Ogura M, Matsuzawa A, Yoshikawa H, Tanaka T.** 2004. *Bacillus subtilis* SalA (YbaL) negatively regulates expression of *scoC*, which encodes the repressor for the alkaline exoprotease gene, *aprE*. *J. Bacteriol.* **186**:3056-64.
236. **Ogura M, Shimane K, Asai K, Ogasawara N, Tanaka T.** 2003. Binding of response regulator DegU to the *aprE* promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49**:1685-97.
237. **Ogura M, Tanaka T.** 1996. *Bacillus subtilis* DegU acts as a positive regulator for *comK* expression. *FEBS Lett.* **397**:173-6.
238. **Ogura M, Tanaka T.** 1997. *Bacillus subtilis* ComK negatively regulates *degR* gene expression. *Mol. Gen. Genet.* **254**:157-65.
239. **Ogura M, Tsukahara K.** 2010. Autoregulation of the *Bacillus subtilis* response regulator gene *degU* is coupled with the proteolysis of DegU-P by ClpCP. *Mol. Microbiol.* **75**:1244-59.
240. **Ogura M, Tsukahara K.** 2012. SwrA regulates assembly of *Bacillus subtilis* DegU via its interaction with N-terminal domain of DegU. *J. Biochem.* **151**:643-55.
241. **Ogura M, Yamaguchi H, Yoshida K, Fujita Y, Tanaka T.** 2001. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res.* **29**:3804-13.
242. **Ogura M, Yoshikawa H, Chibazakura T.** 2013. Regulation of the response regulator gene *degU* through the binding of SinR/SlrR and exclusion of SinR/SlrR by DegU in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*
243. **Ohba M, Hayashi H.** 1979. Studies on bacterial chemotaxis. III. Effect of methyl esters on the chemotactic response of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **85**:1331-8.
244. **Ohsawa T, Tsukahara K, Ogura M.** 2009. *Bacillus subtilis* response regulator DegU is a direct activator of *pgsB* transcription involved in γ -poly-glutamic acid synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**:2096-102.
245. **Ohshima N, Yamashita S, Takahashi N, Kuroishi C, Shiro Y, Takio K.** 2008. *Escherichia coli* cytosolic glycerophosphodiester phosphodiesterase (UgpQ) requires Mg^{2+} , Co^{2+} , or Mn^{2+} for its enzyme activity. *J. Bacteriol.* **190**:1219-23.
246. **Olmos J, de Anda R, Ferrari E, Bolivar F, Valle F.** 1997. Effects of the *sinR* and *degU32* (*Hy*) mutations on the regulation of the *aprE* gene in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **253**:562-7.
247. **Osiewacz HD.** 2002. Onset of Senescence Depends on Environmental and Genetic Conditions, Molecular Biology of Fungal Development. CRC Press.
248. **Ostrowski A, Mehert A, Prescott A, Kiley TB, Stanley-Wall NR.** 2011. YuaB functions synergistically with the exopolysaccharide and TasA amyloid fibers to allow biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **193**:4821-31.
249. **Overmann J.** 2006. Principles of Enrichment, Isolation, Cultivation, and Preservation of Prokaryotes, p 149-207. In Dworkin M, Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E (ed), The Prokaryotes: Vol. 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. Springer-Verlag, New York.
250. **Pallen MJ.** 2002. The ESAT-6/WXG100 superfamily -- and a new Gram-positive secretion system? *Trends Microbiol.* **10**:209-12.
251. **Palva I.** 1982. Molecular cloning of alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene* **19**:81-7.

252. **Pane-Farre J, Lewis RJ, Stulke J.** 2005. The RsbRST stress module in bacteria: a signalling system that may interact with different output modules. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9**:65-76.
253. **Park JT, Uehara T.** 2008. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**:211-27, table of contents.
254. **Parkinson JS, Kofoed EC.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**:71-112.
255. **Perego M.** 1999. Self-signaling by Phr peptides modulates *Bacillus subtilis* development, p 243-58. In G.M.D (ed), *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. American Society for Microbiology, Washington DC.
256. **Perego M, Brannigan JA.** 2001. Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides* **22**:1541-7.
257. **Perezmartin J, Rojo F, Delorenzo V.** 1994. Promoters responsive to DNA bending - a common theme in prokaryotic gene-expression. *Microbiol. Rev.* **58**:268-90.
258. **Petersohn A, Antelmann H, Gerth U, Hecker M.** 1999. Identification and transcriptional analysis of new members of the σ^B regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. **145** (Pt 4):869-80.
259. **Phelan RW, Barret M, Cotter PD, O'Connor PM, Chen R, Morrissey JP, Dobson ADW, O'Gara F, Barbosa TM.** 2013. Subtilomycin: A new lantibiotic from *Bacillus subtilis* Strain MMA7 isolated from the marine sponge *Haliclona simulans*. *Mar. Drugs* **11**:1878-98.
260. **Piggot PJ, Hilbert DW.** 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:579-86.
261. **Pittelkow M, and E. Bremer.** 2011. Cellular adjustment of *Bacillus subtilis* and other Bacilli to fluctuating salinities, p p. 275-302. In Ventosa AO, and Y. Ma (ed), *Halophiles and hypersaline environments - Current research and future trends*, Springer, Heidelberg.
262. **Pottathil M, Lazazzera BA.** 2003. The extracellular Phr peptide-*rap* phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front. Biosci.* **8**:D32-D45.
263. **Pratt LA, Hsing WH, Gibson KE, Silhavy TJ.** 1996. From acids to *osmZ*: Multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**:911-7.
264. **Pratt LA, Silhavy TJ.** 1995. Porin regulation of *Escherichia coli*. ASM Press, Washington, DC.
265. **Prindle A, Liu J, Asally M, Ly S, Garcia-Ojalvo J, Suel GM.** 2015. Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature* **527**:59-63.
266. **Ptashne M.** 1986. Gene-Regulation by Proteins Acting Nearby and at a Distance. *Nature* **322**:697-701.
267. **Reith J, Mayer C.** 2011. Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**:1-11.
268. **Reuter M, Hayward NJ, Black SS, Miller S, Dryden DT, Booth IR.** 2014. Mechanosensitive channels and bacterial cell wall integrity: does life end with a bang or a whimper? *J. R. Soc. Interface.* **11**:20130850.
269. **Roggiani M, Dubnau D.** 1993. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *J. Bacteriol.* **175**:3182-7.
270. **Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R.** 2010. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:2230-4.
271. **Rubenhagen R, Morbach S, Kramer R.** 2001. The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K⁺. *EMBO J.* **20**:5412-20.
272. **Rubinstein SM, Kolodkin-Gal I, Mcloon A, Chai L, Kolter R, Losick R, Weitz DA.** 2012. Osmotic pressure can regulate matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **86**:426-36.
273. **Rudner DZ, Losick R.** 2001. Morphological coupling in development: lessons from prokaryotes. *Dev. Cell* **1**:733-42.
274. **Ruppen ME, Van Alstine GL, Band L.** 1988. Control of intracellular serine protease expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**:136-40.
275. **Russo FD, Silhavy TJ.** 1991. EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J. Mol. Biol.* **222**:567-80.
276. **Rust M, Borchert S, Niehus E, Kuehne SA, Gripp E, Bajceta A, McMurry JL, Suerbaum S, Hughes KT, Josenhans C.** 2009. The *Helicobacter pylori* anti-sigma factor FlgM is predominantly cytoplasmic and cooperates with the flagellar basal body protein FlhA. *J. Bacteriol.* **191**:4824-34.
277. **Ruzal SM, Lopez C, Rivas E, Sanchez-Rivas C.** 1998. Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **36**:75-9.

278. **Ruzal SM, Sanchez-Rivas C.** 1994. Physiological and genetic characterization of the osmotic stress response in *Bacillus subtilis*. *Can. J. Microbiol.* **40**:140-4.
279. **Ruzal SM, Sanchez-Rivas C.** 1998. In *Bacillus subtilis* DegU-P is a positive regulator of the osmotic response. *Curr. Microbiol.* **37**:368-72.
280. **Sambrook J.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
281. **Sargent MG.** 1975. Control of cell length in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **123**:7-19.
282. **Schleifer KH, Kandler O.** 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**:407-77.
283. **Schöck F, Gotsche S, Dahl MK.** 1996. Vectors using the phospho- α -(1,1)-glucosidase-encoding gene *treA* of *Bacillus subtilis* as a reporter. *Gene* **170**:77-80.
284. **Seminara A, Angelini TE, Wilking JN, Vlamakis H, Ebrahim S, Kolter R, Weitz DA, Brenner MP.** 2012. Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**:1116-21.
285. **Setlow P.** 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *J. Bacteriol.* **196**:1297-305.
286. **Shank EA, Klepac-Ceraj V, Collado-Torres L, Powers GE, Losick R, Kolter R.** 2011. Interspecies interactions that result in *Bacillus subtilis* forming biofilms are mediated mainly by members of its own genus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**:E1236-43.
287. **Shank EA, Kolter R.** 2011. Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**:741-7.
288. **Shimane K, Ogura M.** 2004. Mutational analysis of the helix-turn-helix region of *Bacillus subtilis* response regulator DegU, and identification of cis-acting sequences for DegU in the *aprE* and *comK* promoters. *J. Biochem.* **136**:387-97.
289. **Shimotsu H, Henner DJ.** 1986. Modulation of *Bacillus subtilis* levansucrase gene expression by sucrose and regulation of the steady-state mRNA level by *sacU* and *sacQ* genes. *J. Bacteriol.* **168**:380-8.
290. **Shiwa Y, Yoshikawa H, Tanaka T, Ogura M.** 2015. *Bacillus subtilis* *degSU* operon is regulated by the ClpXP-Spx regulated proteolysis system. *J. Biochem.* **157**:321-30.
291. **Silhavy TJ, Kahne D, Walker S.** 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**:a000414.
292. **Simonen M, Palva I.** 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* **57**:109-37.
293. **Sinai L, Rosenberg A, Smith Y, Segev E, Ben-Yehuda S.** 2015. The molecular timeline of a reviving bacterial spore. *Mol. Cell.* **57**:695-707.
294. **Smith TJ, Blackman SA, Foster SJ.** 2000. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology.* **146** (Pt 2):249-62.
295. **Sogaard-Andersen L, Overgaard M, Lobedanz S, Ellehauge E, Jelsbak L, Rasmussen AA.** 2003. Coupling gene expression and multicellular morphogenesis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **48**:1-8.
296. **Spiegelhalter F, Bremer E.** 1998. Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. *Mol. Microbiol.* **29**:285-96.
297. **Spizizen J.** 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**:1072-8.
298. **Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, Cox JS.** 2003. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:13001-6.
299. **Steil L, Hoffmann T, Budde I, Völker U, Bremer E.** 2003. Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J. Bacteriol.* **185**:6358-70.
300. **Steinmetz M, Kunst F, Dedonder R.** 1976. Mapping of mutations affecting synthesis of exocellular enzymes in *Bacillus subtilis*. Identity of the *sacUh*, *amyB* and *pap* mutations. *Mol. Gen. Genet.* **148**:281-5.
301. **Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:183-215.

302. **Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM.** 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**:450-90.
303. **Strauch MA, Spiegelman GB, Perego M, Johnson WC, Burbulys D, Hoch JA.** 1989. The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. *EMBO J.* **8**:1615-21.
304. **Street TO, Bolen DW, Rose GD.** 2006. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:13997-4002.
305. **Tachibana K, Yoda K, Watanabe S, Kadokura H, Katayama Y, Yamane K, Yamasaki M, Tamura G.** 1987. Secretion of *Bacillus subtilis* α -amylase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1775-82.
306. **Tajkhorshid E, Nollert P, Jensen MO, Miercke LJ, O'Connell J, Stroud RM, Schulten K.** 2002. Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* **296**:525-30.
307. **Tam NK, Uyen NQ, Hong HA, Duc le H, Hoa TT, Serra CR, Henriques AO, Cutting SM.** 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J. Bacteriol.* **188**:2692-700.
308. **Tanaka K, Iwasaki K, Morimoto T, Matsuse T, Hasunuma T, Takenaka S, Chumsakul O, Ishikawa S, Ogasawara N, Yoshida K.** 2015. Hyperphosphorylation of DegU cancels CcpA-dependent catabolite repression of *rocG* in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiol.* **15**:43.
309. **Tanaka T, Kawata M, Mukai K.** 1991. Altered phosphorylation of *Bacillus subtilis* DegU caused by single amino acid changes in DegS. *J. Bacteriol.* **173**:5507-15.
310. **Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois JY, Westers H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, van Dijk JM.** 2004. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:207-33.
311. **Tobisch S, Zuhlke D, Bernhardt J, Stulke J, Hecker M.** 1999. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:6996-7004.
312. **Tsukahara K, Ogura M.** 2008. Characterization of DegU-dependent expression of *bpr* in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **280**:8-13.
313. **Tsukahara K, Ogura M.** 2008. Promoter selectivity of the *Bacillus subtilis* response regulator DegU, a positive regulator of the *fla/che* operon and *sacB*. *BMC Microbiol.* **8**:8.
314. **van Dam JC, Ras C, ten Pierick A.** 2011. Analysis of glycolytic intermediates with ion chromatography- and gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* **708**:131-46.
315. **Veening JW, Igoshin OA, Eijlander RT, Nijland R, Hamoen LW, Kuipers OP.** 2008. Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Mol. Syst. Biol.* **4**:184.
316. **Ventosa A, Nieto JJ, Oren A.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:504-44.
317. **Verhamme DT, Kiley TB, Stanley-Wall NR.** 2007. DegU co-ordinates multicellular behaviour exhibited by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **65**:554-68.
318. **Verhamme DT, Murray EJ, Stanley-Wall NR.** 2009. DegU and Spo0A jointly control transcription of two loci required for complex colony development by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **191**:100-8.
319. **Völker U, Maul B, Hecker M.** 1999. Expression of the σ^B -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:3942-8.
320. **Vollmer W, Bertsche U.** 2008. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**:1714-34.
321. **Vollmer W, Holtje JV.** 2001. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:625-33.
322. **Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S.** 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:259-86.
323. **von Blohn C, Kempf B, Kappes RM, Bremer E.** 1997. Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor σ^B . *Mol. Microbiol.* **25**:175-87.
324. **Voskuil MI, Chambliss GH.** 1998. The -16 region of *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacterial promoters. *Nucleic Acids Res.* **26**:3584-90.
325. **Wang JC, Giaeever GN.** 1988. Action at a distance along a DNA. *Science* **240**:300-4.

326. **Wang LC, Morgan LK, Godakumbura P, Kenney LJ, Anand GS.** 2012. The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm. *EMBO J.* **31**:2648-59.
327. **Warmbold B.** 2015. Untersuchung der Regulation des *yqiHIK* Operons in *Bacillus subtilis* während der Sporulation. . Master of Science. Philipps Universität Marburg.
328. **Waukau J, Forst S.** 1992. Molecular analysis of the signaling pathway between EnvZ and OmpR in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:1522-7.
329. **Weidel W, Pelzer H.** 1964. Bagshaped Macromolecules--a New Outlook on Bacterial Cell Walls. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **26**:193-232.
330. **Weinrauch Y, Penchev R, Dubnau E, Smith I, Dubnau D.** 1990. A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes Dev.* **4**:860-72.
331. **Whatmore AM, Chudek JA, Reed RH.** 1990. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2527-35.
332. **Whatmore AM, Reed RH.** 1990. Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2521-6.
333. **Widderich N, Rodrigues CD, Commichau FM, Fischer KE, Ramirez-Guadiana FH, Rudner DZ, Bremer E.** 2015. Salt-sensitivity of s^H and Spo0A prevents sporulation of *Bacillus subtilis* at high osmolarity avoiding death during cellular differentiation. *Mol. Microbiol.*
334. **Winkelman JT, Blair KM, Kearns DB.** 2009. RemA (Ylza) and RemB (YaaB) regulate extracellular matrix operon expression and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **191**:3981-91.
335. **Winkelman JT, Bree AC, Bate AR, Eichenberger P, Gourse RL, Kearns DB.** 2013. RemA is a DNA-binding protein that activates biofilm matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **88**:984-97.
336. **Wolfe AJ.** 2010. Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**:204-9.
337. **Wood JM, Bremer E, Csonka LN, Kraemer R, Poolman B, van der Heide T, Smith LT.** 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* **130**:437-60.
338. **Xu S, Zhou JW, Liu LM, Chen J.** 2011. Arginine: A novel compatible solute to protect *Candida glabrata* against hyperosmotic stress. *Process Biochem.* **46**:1230-5.
339. **Yan X, Yu HJ, Hong Q, Li SP.** 2008. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5556-62.
340. **Yang M, Ferrari E, Chen E, Henner DJ.** 1986. Identification of the pleiotropic *sacQ* gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **166**:113-9.
341. **Yasumura A, Abe S, Tanaka T.** 2008. Involvement of nitrogen regulation in *Bacillus subtilis degU* expression. *J. Bacteriol.* **190**:5162-71.
342. **Yoshida T, Phadtare S, Inouye M.** 2007. Functional and structural characterization of EnvZ, an osmosensing histidine kinase of *E. coli*. *Methods Enzymol.* **423**:184-202.
343. **Young JW, Locke JC, Elowitz MB.** 2013. Rate of environmental change determines stress response specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**:4140-5.
344. **Yu X, Xie J.** 2012. Roles and underlying mechanisms of ESAT-6 in the context of *Mycobacterium tuberculosis*-host interaction from a systems biology perspective. *Cell Signal* **24**:1841-6.
345. **Yuan J, Wei B, Shi M, Gao H.** 2011. Functional assessment of EnvZ/OmpR two-component system in *Shewanella oneidensis*. *PLoS One* **6**:e23701.
346. **Zafra O, Lamprecht-Grandio M, de Figueras CG, Gonzalez-Pastor JE.** 2012. Extracellular DNA release by undomesticated *Bacillus subtilis* is regulated by early competence. *PLoS One* **7**.
347. **Zaprasis A, Bleisteiner M, Kerres A, Hoffmann T, Bremer E.** 2015. Uptake of amino acids and their metabolic conversion into the compatible solute proline confers osmoprotection to *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**:250-9.
348. **Zaprasis A, Brill J, Thuring M, Wunsche G, Heun M, Barzantny H, Hoffmann T, Bremer E.** 2013. Osmoprotection of *Bacillus subtilis* through import and proteolysis of proline-containing peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:576-87.

VIII Anhang

1 Northern Blot Analyse des *degSU* Operons

Um die *treA* Ergebnisse zu bestätigen und die Operonstruktur des DegS-DegU TCS unter Salzstress zu untersuchen wurde ein Northern Blot durchgeführt. Hierfür wurden der *B. subtilis* Wildtyp (168), die DegS-Hypermutable [SLB169; *degS200*(Hy)] und die Deletionsmutante (SLB40; Δ *degSU*) in Helmann Minimalmedium ohne und mit der Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und anschließend geerntet. Aus diesen Zellen wurde dann die gesamte RNA isoliert und 10 µg dieser RNA auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Danach wurde die RNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Digoxigenin-markierten Anti-Sense RNA Sonde hybridisiert. Diese Sonde ist entweder spezifisch für *degS* oder *degU* (Abb. 49 A).

Durch die *degS* Sonde (Abb. 49 B) konnte ein einzelnes Fragment mit einer Länge knapp über 2000 bp detektiert werden, welche der Größe des *degSU* Operons entspricht. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass *yviA* noch mit transkribiert wird, da ein größeres Fragment (2873 bp) entstanden wäre. Das circa 2000 bp lange Fragment taucht nicht in der *degSU* Deletionsmutante auf, sodass dieses spezifisch für das *degSU* Operon ist. Durch den Northern Blot konnte die Salzinduktion bestätigt werden, da bei der 0 M Probe im Wildtyp kaum eine Bande zu erkennen ist, dies aber bei 1,2 M klar der Fall ist. Interessanterweise und im Gegensatz zu der Reportergeranalyse konnte in der DegS-Hypermutable eine erhöhte Expression des *degSU* Operons unter beiden getesteten Bedingungen festgestellt werden. Ein Grund könnte sein, dass die *treA* Fusion nicht den gesamten DegU~P regulatorischen Bereich von *degSU* abdeckt und so die Expression im Wildtyp und der DegS-Hypermutable ähnlich ist. Durch den Northern Blot wird die gesamte RNA analysiert und so auch der gesamte regulatorische Bereich abgedeckt. Schwankungen in der RNA Stabilität können auch zu einem geänderten Expressionsmuster führen. Für die *degU* Sonde (Abb. 49 B) konnte auch nur ein einzelnes Fragment mit einer Größe unterhalb von 1000 bp detektiert werden. Dieses Fragment entsteht sehr wahrscheinlich durch den *degU*_{P3} Promotor. Der Grund liegt darin, dass die mRNA Menge dieses Fragments durch erhöhte Konzentrationen an DegU~P (in der DegS-Hypermutable) gesteigert werden kann. Dieses Expressionsmuster konnte nur für den *degU*_{P3} Promotor gezeigt werden. Die Salzinduktion, die schon in den Reportergeranalysen festgestellt wurde, konnte bestätigt werden. Auch diese detektierte Bande ist spezifisch für *degU*, da sie nicht in der *degSU* Deletionsmutante detektiert werden konnte. Neben dieser Bande, würde man aber eine weitere Bande erwarten, die dem gesamten *degSU* Operon entspricht, jedoch konnte keine zweite Bande detektiert werden. Ein Grund könnte die Detektionsmethode sein, da die *degU* mRNA sehr schnell detektierbar ist und die mRNA des gesamten Operons nur schwach exprimiert wird. Dadurch ergeben sich zwei stark unterschiedliche Detektionszeiten der beiden Transkripte, die unter den getesteten Bedingungen nicht visualisierbar sind.

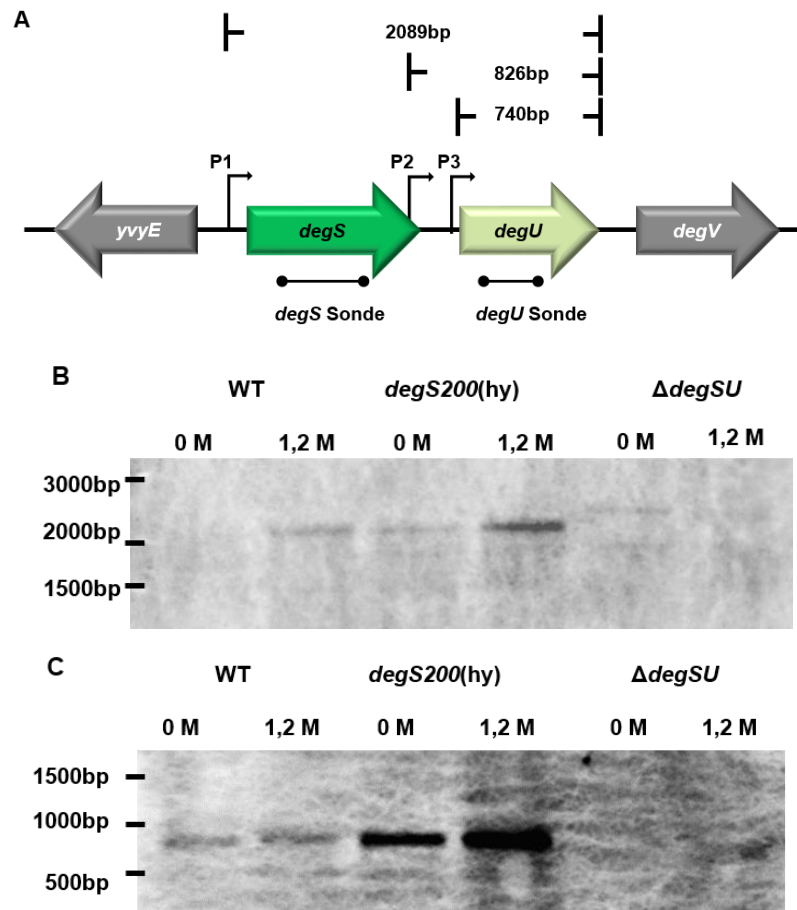


Abb. 49: Northern Blot Analyse des DegS-DegU TCS

(A) Abgebildet ist eine schematische Darstellung des DegS-DegU Operon mit der Lage der beiden Sonden und der zu erwartenden Größe der Fragmente. Für die *degS* Sonde (B) und die *degU* Sonde (C) wurden Zellen des Wildtyps 169 (Wildtyp), der DegS-Hypermutable SLB169 [*degS200(Hy)*] und des Deletionsstammes SLB40 (Δ *degSU*) in Helmann Minimalmedium unter physiologischen und hyperosmotischen Bedingungen kultiviert, geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde für die anschließende Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden verwendet. Die Northern Blot Ergebnisse konnten bisher nur einmalig nachgewiesen werden.

2 Northern Blot Analyse des *rapG-phrG* Operons

Es wurden Zellen des Wildtyps 168, des Δ *rapG-phrG* Deletionsstammes (SLB7), des *degSU* Deletionsstammes (SL40) sowie der DegS-Hypermutable (SLB169) in HMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert und Proben während der exponentiellen Phase geerntet. Aus diesen Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und dann im Northern Blot wie bereits beschrieben eingesetzt. Die Lage der Sonden für *rapG* und *phrG* sind in Abb. 50 A aufgeführt.

Vorläufige Ergebnisse des Northern Blots zeigen, dass durch die *rapG* Sonde ein Transkript zwischen 1000 bp und 1500 bp detektiert werden konnte, welches nicht in der Δ *rapG-phrG* Mutante detektierbar ist (Abb. 50 B). Dadurch zeigt sich, dass es sich bei dem *rapG-phrG* Gencluster um eine Transkriptionseinheit handelt. Weiterhin zeigt sich, dass der Promotor vor *rapG* salzinduzierbar ist. Interessanterweise konnte mit der *rapG* Sonde noch ein größeres Fragment von circa 2500 bp detektiert werden. Dieses Transkript erscheint aber auch in der *rapG-phrG* Deletionsmutante, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich nicht um ein längeres *rapG* Transkript handelt. Ferner zeigt das

lange Transkript eine Abhängigkeit von DegU~P, die zusätzlich salzinduzierbar ist. Vorläufige Ergebnisse mit der *phrG* Sonde zeigen zwei Fragmente, eins bei circa 1500 bp und das andere bei circa 400 bp (Abb. 50 C). Das kürzere und das längere Fragment zeigen eine klare Salzinduktion, jedoch ist in der *degS200(Hy)* Mutante keine Salzinduktion feststellbar (Abb. 50 C). Das längere Fragment könnte dem gesamten *rapG-phrG* Genlokus entsprechen und das circa 400 bp Fragment dem *phrG* Transkript. Mit dieser Sonde konnte jedoch kein noch größeres Transkript detektiert werden, sodass deutlich wird, dass die *rapG* Sonde eine weitere unspezifische Bindung mit einer anderen mRNA eingeht.

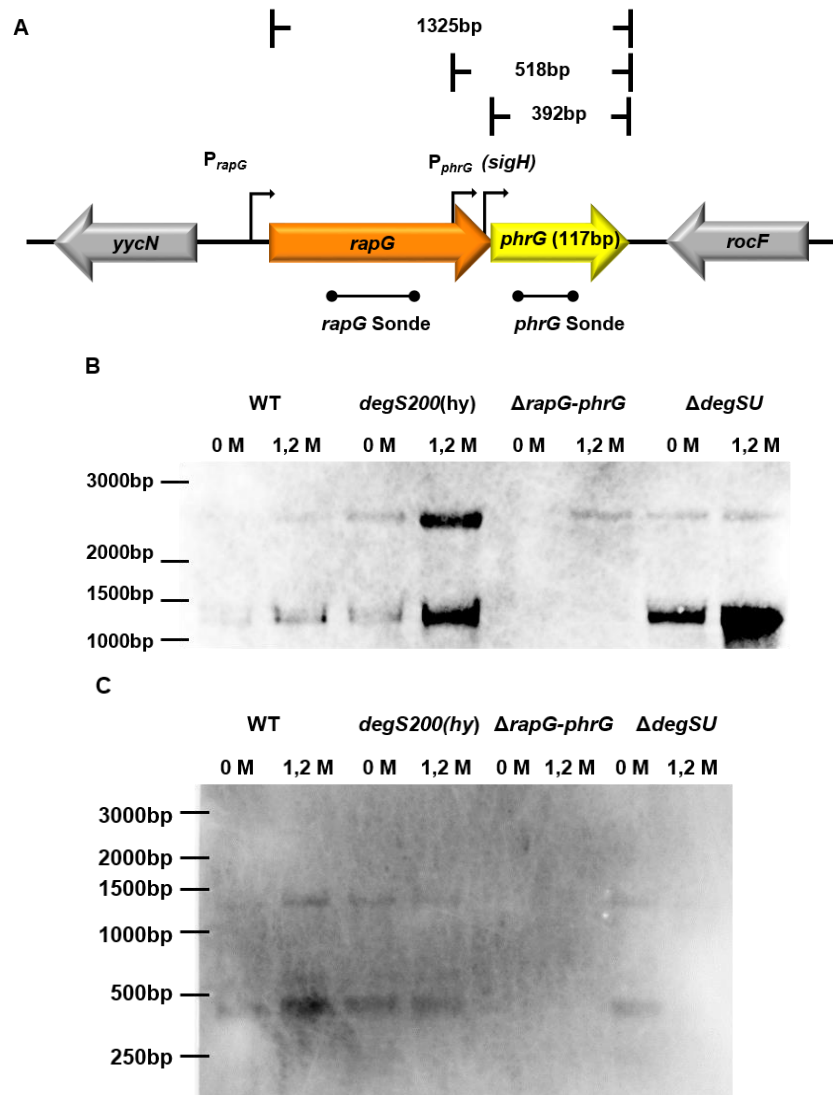


Abb. 50: Northern Blot Analyse des *rapG-phrG* Operons

(A) Abgebildet ist eine schematische Darstellung des *rapG-phrG* Operons mit der Lage der beiden Sonden und der erwartenden Größe der Fragmente. Für die *rapG* Sonde (B) und die *phrG* Sonde (C) wurden Zellen des Wildtyps 169 (Wildtyp), der DegS-Hypermutable SLB169 [*degS200(Hy)*], des Deletionsstamms SLB8 ($\Delta rapG-phrG$) und des Deletionsstammes SLB40 ($\Delta degSU$) in Hellmann Minimalmedium unter physiologischen und hyperosmotischen Bedingungen kultiviert, geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde für die anschließende Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden verwendet. Die Northern Blot Ergebnisse konnten bisher nur einmalig nachgewiesen werden.

3 Wachstumsanalyse des DegS-DegU TCS in *B. subtilis*

Für die Analyse des Einflusses von Glycin-Betain auf den Wildtyp 168 und die DegS-DegU TCS Mutanten [SLB40, $\Delta degSU$; SLB49, $degU32(Hy)$ und SLB169, $degS200(Hy)$] wurden die Stämme in SMM mit der Zugabe von 1 mM Glycin-Betain inkubiert und das Wachstum photometrisch über mehrere Stunden dokumentiert (Abb. 51).

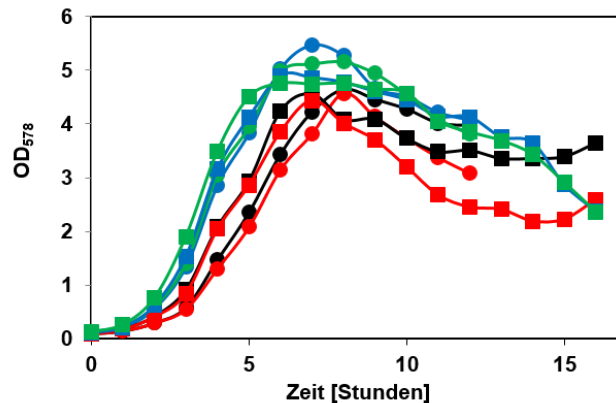


Abb. 51: Wachstumskurve der DegS-DegU TCS Mutanten unter physiologischen Bedingungen mit und ohne die Zugabe von Glycin-Betain

Die Stämme Wildtyp 168 (schwarz), SLB40 ($\Delta degSU$, rot), SLB49 [$degU32(Hy)$, blau] und SLB169 [$degS200(Hy)$, grün] wurden in SMM ohne (gefüllte Kreise) und mit (gefüllte Vierecke) die Zugabe von 1 mM Glycin-Betain kultiviert und das Wachstum photometrisch jede Stunde gemessen. Die Wachstumskurve wurde zweimal mit zwei biologischen reproduziert, dabei ist hier eine der beiden Wachstumskurven abgebildet.

4 Einfluss des DegS-DegU TCS auf die Prolinkonzentration

Neben der Analyse des Einflusses des DegS-DegU TCS auf die intrazellulären Prolinkonzentrationen sollte auch die Prolinkonzentration im Überstand bestimmt werden. Um diesen Einfluss nachzuweisen wurde der intrazelluläre Prolingehalt mittels der von Bates *et al.* beschriebenen Methode (im weiteren Verlauf als Bates-Test betitelt) bestimmt [Material und Methoden 5.4; (23)]. Hierfür wurden die Stämme Wildtyp 168, SLB40 ($\Delta degSU$), SLB49 (DegU-Hypermutable) und SLB169 (DegS-Hypermutable) in SMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und bei einer OD_{578} von $2 (\pm 0,2)$ geerntet und dann in den Bates-Test eingesetzt. Dieser Test beruht auf einem kolorimetrischen Nachweis, bei dem Ninhydrin einen roten Farbkomplex mit Prolin bildet. Diese Rotfärbung kann photometrisch bestimmt werden und ist zurück rechenbar auf die Menge an Prolin in der Zelle.

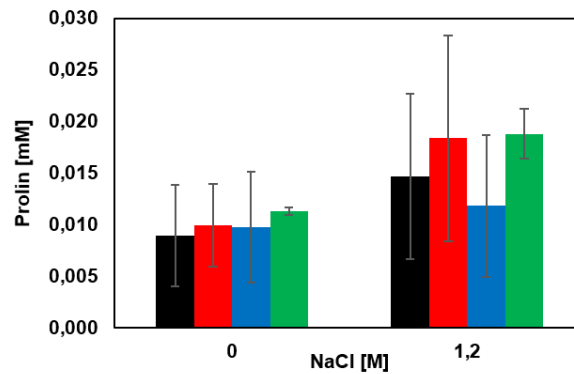
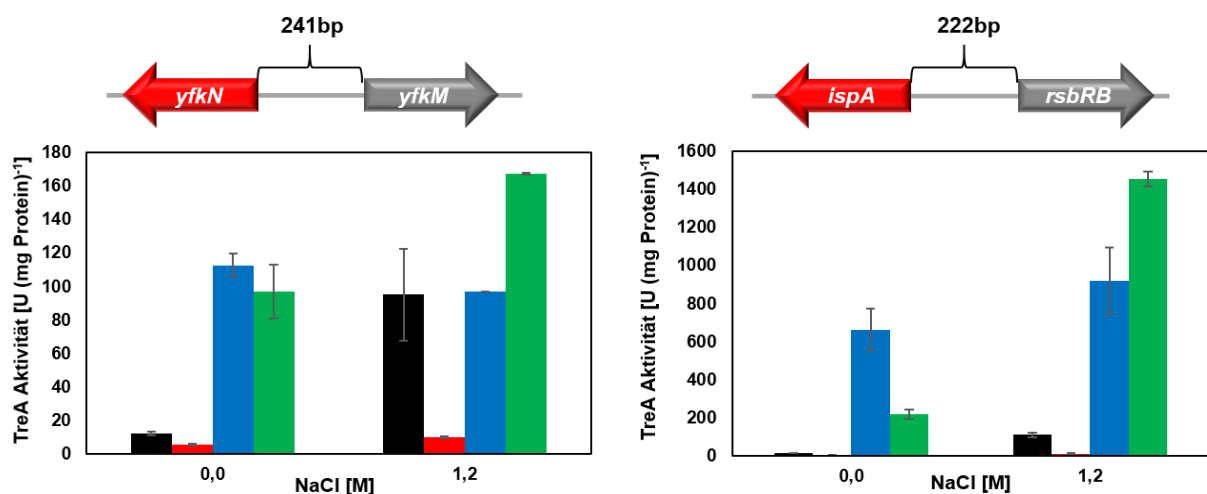


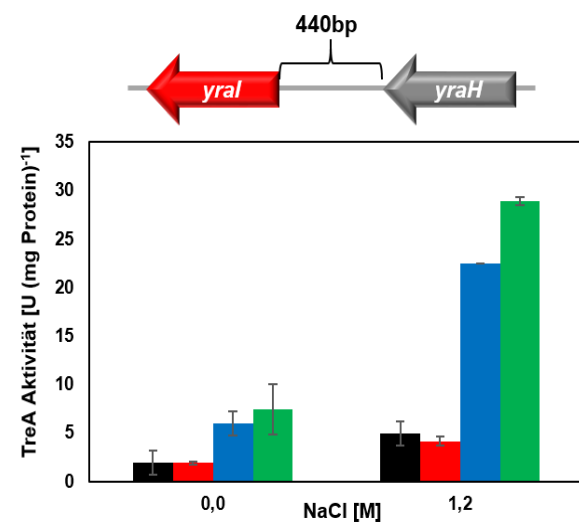
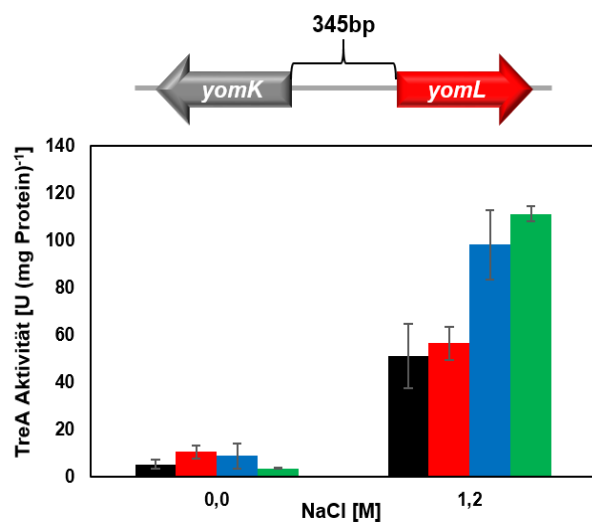
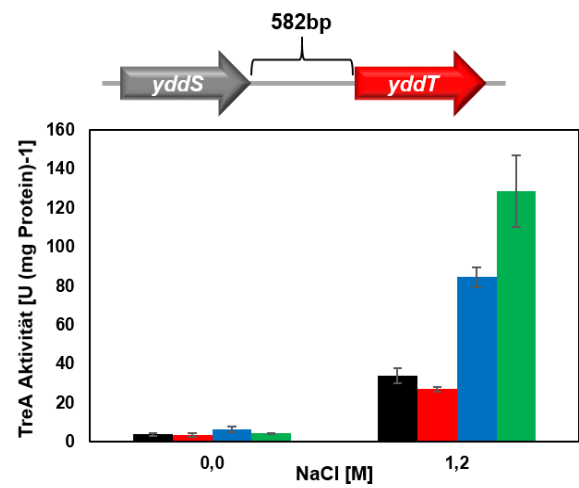
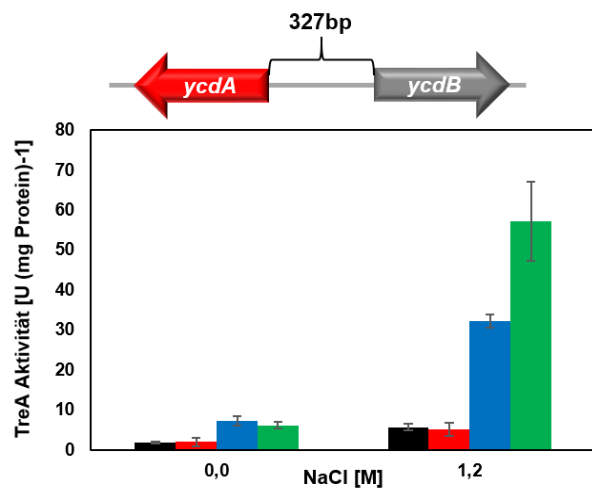
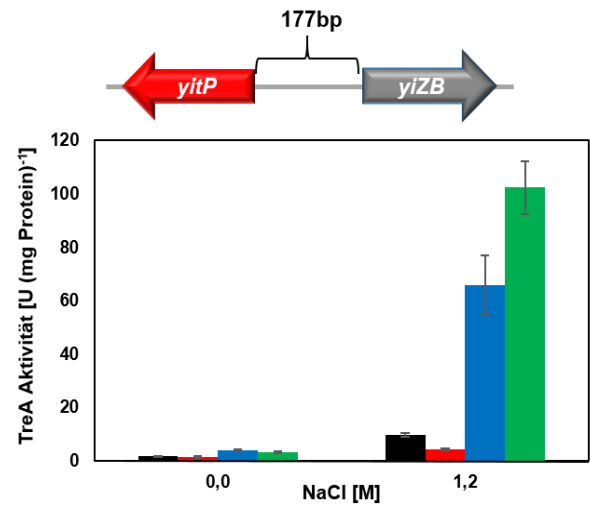
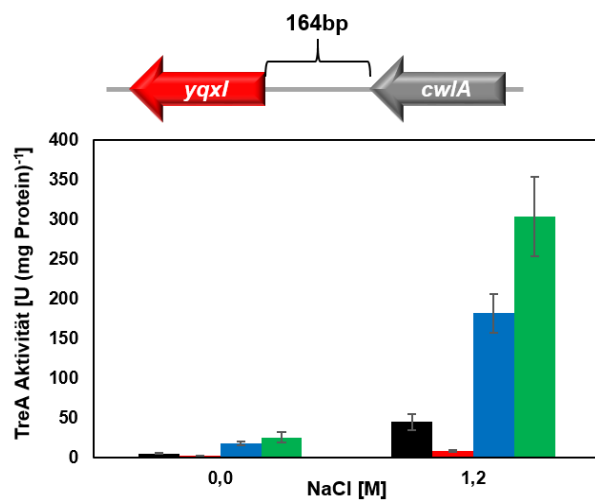
Abb. 52: Einfluss des DegS-DegU TCS auf die Prolinkonzentration im Überstand

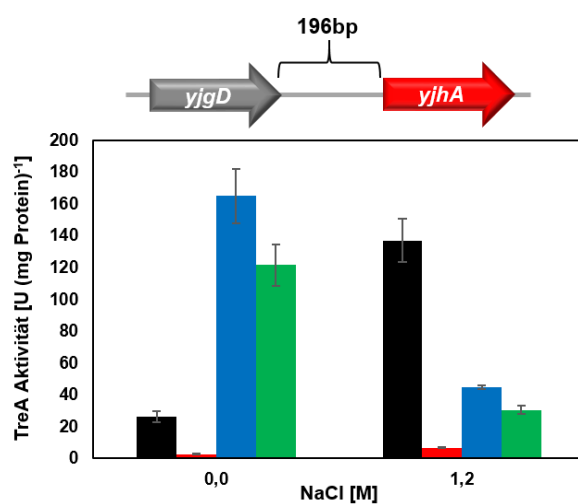
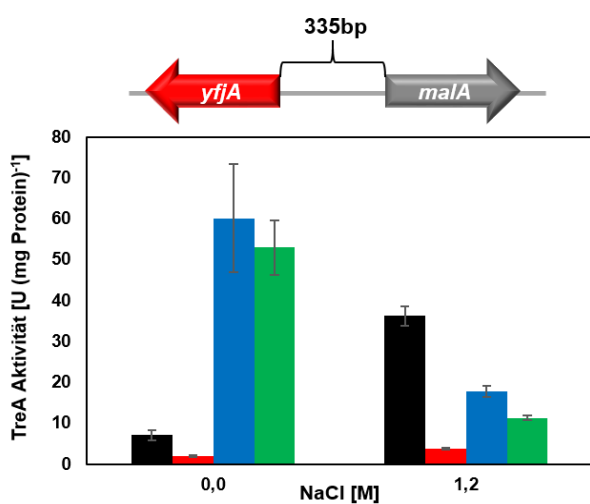
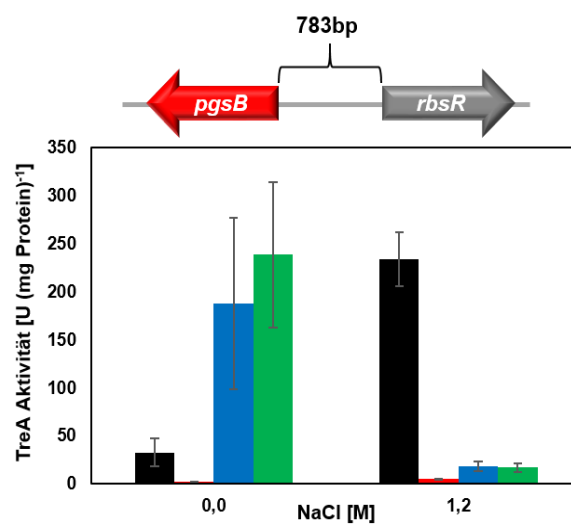
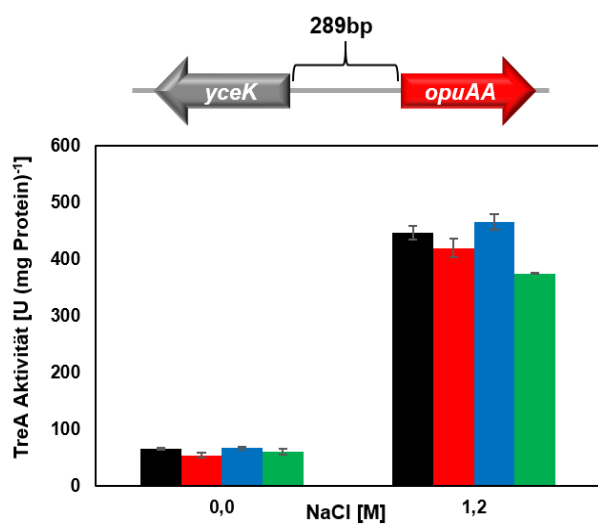
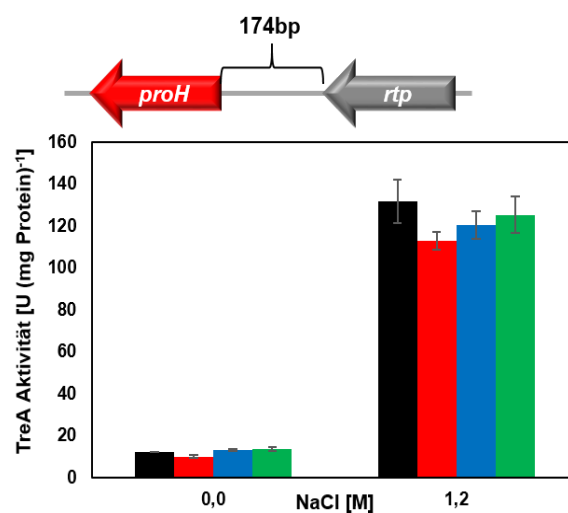
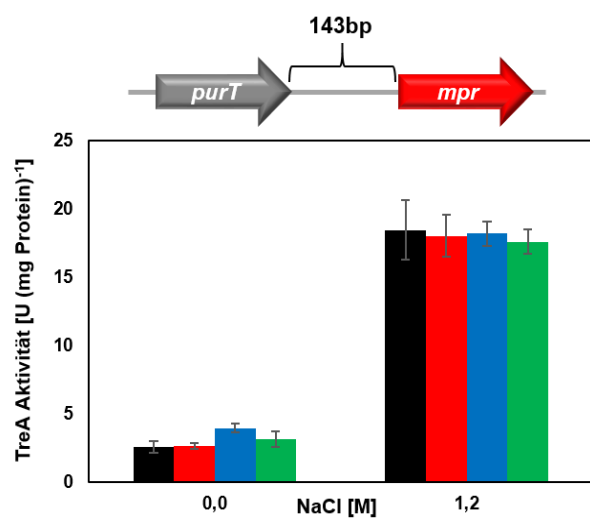
(A) Bestimmung der intrazellulären Prolin Konzentration in den Stämmen 168 (Wildtyp, schwarz), SLB40 ($\Delta degSU$, rot), SLB49 [$degU32(Hy)$] und SLB169 [$degS200(Hy)$]. Die Stämme wurden in SMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert wurden, bei einer OD_{578} von 2 geerntet wurden und mittels des anschließenden Bates-Test wurde die Prolinkonzentration im Überstand bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

5 Reportergenanalyse der Gene aus dem Überlapp des DegU~P Regulons und des Salz-Modulons

Die Analyse der Gene aus dem DegU~P Regulon und dem Salz-Modulon erfolgte über Reportergenfusionen. Hierfür wurden zu allen untersuchten Gene eine Reportergenfusion hergestellt, welche dann in den Wildtyp 168, die $degSU$ Deletionsmutante und die DegU-Hypermutable, sowie DegS-Hypermutable eingebracht wurde. Die entstandenen Stämme sind Tabelle 18 zu entnehmen. Die diversen Stämme wurden in HMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert, in der mittleren exponentiellen Phase wurden Proben geerntet, welche dann in den TreA-Enzymassay eingesetzt wurden. Abb. 53 führt alle einzelnen Ergebnisse für die jeweiligen Reportergenkonstrukte auf.







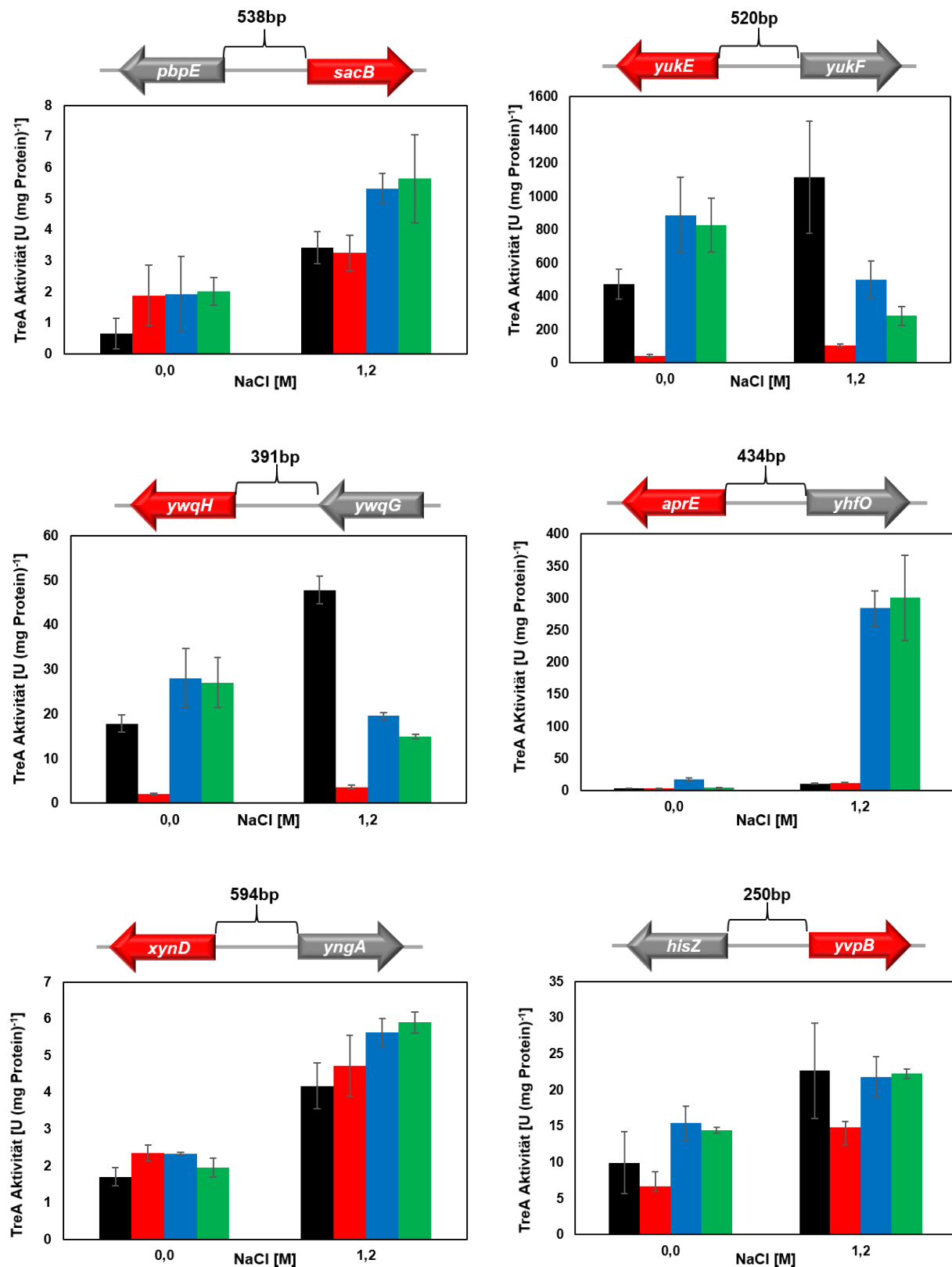


Abb. 53: Reporteranalysen der Gene aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons

Gezeigt sind die Ergebnisse des TreA-Enzymassays der verschiedenen Reporter-genkonstrukte aus dem Überlapp des DegU-Regulons und des Salz-Modulons. Über den Graphen sind die jeweiligen Gene mit dem intergenen Bereich dargestellt. Rote Pfeile zeigen das Gen welches zur *treA* Fusion genutzt wurde. Graue Pfeile stellen das stromaufwärts gelegene Gen dar. Die Länge der intergenen Region ist eingezeichnet. Die Länge der Fusionskonstrukte, sowie die Stämme die durch Kombination mit dem Wildtyp, der *degSU* Deletionsmutante, der DegU-Hypermutable und der DegS-Hypermutable entstanden sind, sind in Tabelle 18 aufgeführt. Die Stämme

wurden in HMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert. Bei einer OD₅₇₈ von $1,5 \pm 0,2$ wurden Proben gezogen, die anschließend in den TreA-Aktivitätstest eingesetzt wurden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet

6 Einfluss des alternativen Transkriptionsfaktors σ^B auf die Expression des T7SS

Neben der Analyse des Einflusses der Biofilmregulatoren auf das T7SS wurde auch der Einfluss des allgemeinen Stresssigmafaktors SigB analysiert. Hierfür wurde die *yukE-treA* Fusion in ein *sigB* Deletionsmutante eingebracht. Der Wildtyp 168 (SLB155) und die $\Delta sigB$ Mutante (SLB273) wurden in HMM mit und ohne die Zugabe von 1,2 M NaCl kultiviert und in der exponentiellen Phase wurden Proben für den TreA-Aktivitätsassay geerntet. Das Ergebnis in Abb. 54 zeigt, dass die Deletion von SigB keinen Einfluss das T7SS hat.

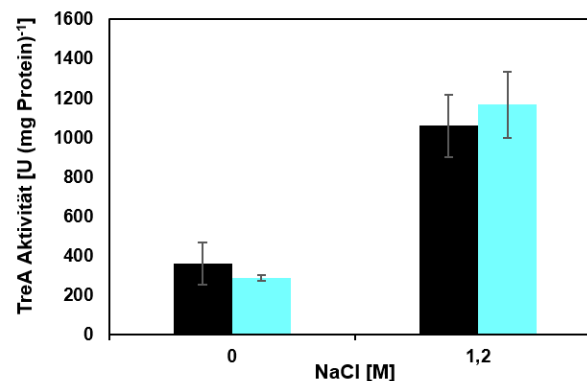


Abb. 54: Einfluss von SigB auf die Expression des T7SS

Abgebildet ist die TreA-Aktivität der *yukE-treA* Wildtypfusion von *B. subtilis* Kulturen, die in HMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert wurde und Proben in der exponentiellen Phase gezogen wurden (OD₅₇₈ $1,5 \pm 0,2$). Folgende Stämme wurden verwendet: SLB155 (Wildtyp, schwarz) und SLB273 ($\Delta sigB$, Türkis). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

7 Die Verlängerung der *yqiH-treA* Reportergenfusion

Das *yqiHIK* Operon weist einen langen intergenen Bereich von 500 bp zum stromaufwärts gelegene *yqiG* Gen auf. Dieser große Abstand ist eher untypisch für *B. subtilis*, sodass die Vermutung nahelag, dass auf dieser langen Sequenz sich ein weiteres regulatorisches Element befinden könnte. Um zu testen, ob weiter stromaufwärts noch wichtige Bereiche liegen, wurde eine *treA* Fusion konstruiert, die den kompletten intergenen Bereich abdeckt (SLB159). Die Stämme KFB41 (*yqiH'*_{300bp}) und SLB159 (*yqiH'*_{500bp}) wurden in SMM \pm 1,2 M NaCl inkubiert und in der exponentiellen Phase wurden Proben geerntet. Diese Proben wurden anschließend in den TreA-Aktivitätsassay eingebracht, der zeigte das eine Verlängerung der *yqiH-treA* Fusion (SLB159) zu keiner Veränderung der Promotoraktivität im Vergleich zu einer kürzeren Fusion führt.

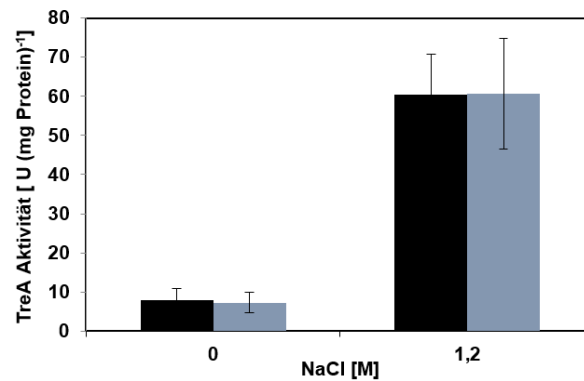


Abb. 55: Der Einfluss einer längeren *treA* Fusion auf die *yqiHIK* Promotoraktivität

Abgebildet ist die TreA-Aktivität der von *B. subtilis* Kulturen, die in SMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert wurde und Proben in der exponentiellen Phase gezogen wurden (OD_{578} $1,5 \pm 0,2$). Folgende Stämme wurden verwendet: KFB41 (*yqiH*^{300 bp} -*treA*), schwarz) und SLB159 (*yqiH*^{500 bp} -*treA*, blau). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Parallelen mit jeweils 2 technischen Parallelen berechnet.

8 Gel-Filtrationsanalyse des gereinigten DegU Proteins

Das Protein DegU aus *B. subtilis* wurde mit einem Strep-Tag versehen und anschließend in *E. coli* heterolog überproduziert (Material und Methoden 5.6). Die Aufreinigung erfolgte über die ÄKTAbasis der Firma GE Healthcare Europe (München, D) aufgereinigt und anschließend mittels einer HiLoad Superdex 200pg Gelfiltrationsanalyse nach der Größe aufgetrennt (Abb. 57). Dadurch konnte ein Elutionsvolumen von 90,8 ml bestimmt werden. Anhand einer Kalibrierungsgeraden (Abb. 56) konnte eine Größe für das gereinigte Protein von 26 kDa berechnet werden. Sowohl von den Standardproteinen, als auch von dem gereinigten DegU Protein wurden 2 mg/ml aufgetragen. Eine Größe von 26 kDa entspricht einem DegU Monomer, da in der Gelfiltrationsanalyse keine weiteren Peaks aufgetreten sind konnte DegU nicht als Dimer aufgereinigt werden.

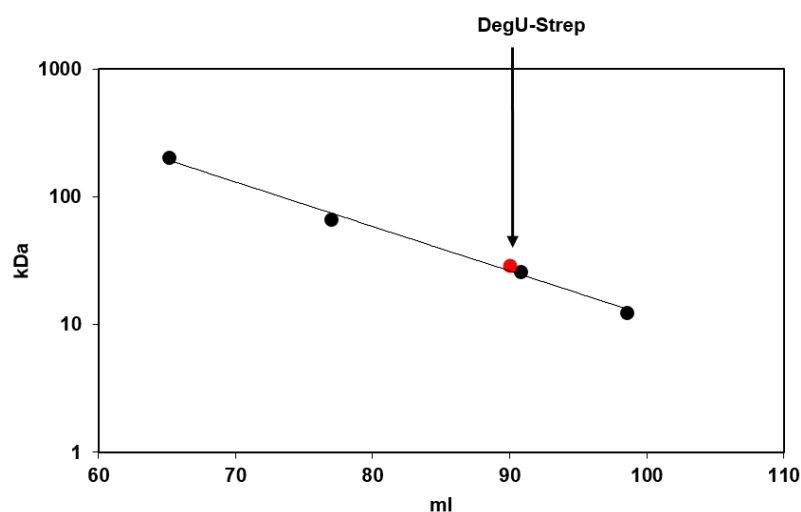


Abb. 56: Standardgerade der Referenzproteine auf der HiLoad Superdex 200pg

Anhand der Elutionsvolumen der Referenzproteine β -Amylase aus der Süßkartoffel (200 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa), einer Rinder Carboanhydrase (29 kDa) und des Cytochrom C aus Pferdeherzen (12,4 kDa) kann eine Kalibrierungsgerade erstellt werden. Mit dieser kann die native Größe des DegU-Strep Proteins berechnet werden. Der rote Punkt entspricht dem Peak aus der Gelfiltrationsanalyse bei einem Elutionsvolumen von 90,8 ml und damit einer Größe von circa 26 kDa.

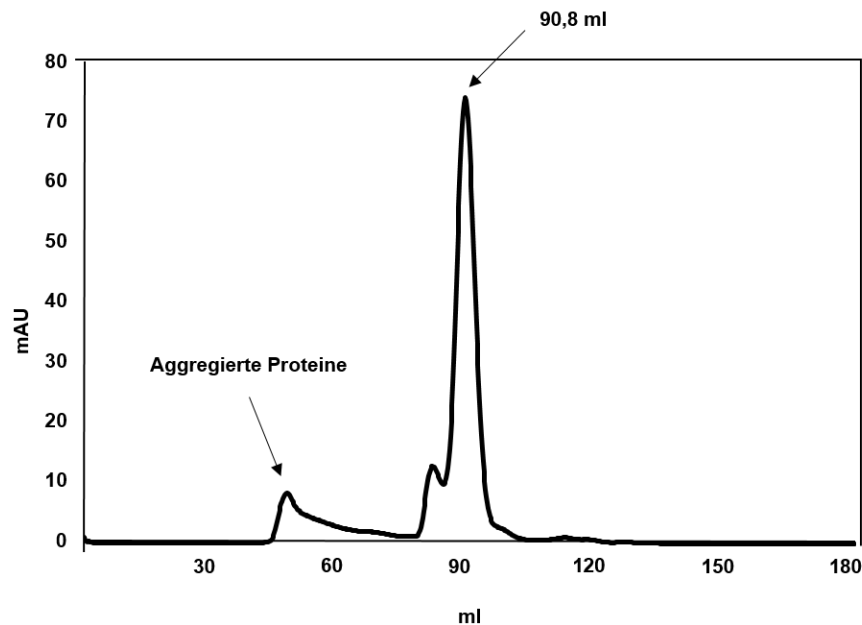


Abb. 57. Gelfiltrationslauf von DegU aus *B. subtilis*

Dargestellt ist der Elutionspeak von DegU aus *B. subtilis*. Das Protein wurde heterlog in *E. coli* überproduziert und über den angehängten Strep-Tag aufgereinigt. Anschließend wurde das Protein über die HiLoad Superdex 200pg Säule nach der Größe aufgetrennt.

9 Vorexperimente zu den geplanten Microarray Analysen

Die Microarray Analysen sollten vier Sachverhalte genauer durchleuchten:

- (i) Das erste Salz-Modulon (299) basiert auf einer Macroarray Analyse. Durch den Fortschritt der Technologie und der modernen Microarray Analysen sollte das Salz-Modulon bestätigt werden. Außerdem sollte getestet werden ob es noch weitere salzinduzierbare Gene gibt, die bei den damaligen Macroarray Analysen nicht identifiziert wurden.
- (ii) Durch den degSU Deletionsstamm können eindeutig Gene identifiziert werden, deren Expression von dem DegS-DegU TCS abhängen, sowohl unter isoosmotischen, als auch unter hyperosmotischen Bedingungen
- (iii) Die bisherigen DegU-Regulons basieren auf verschiedenen Bedingungen. Dabei nutzten Ogura und Kollegen ein nicht physiologisches System, indem *degU* unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren Promotors war und zusätzlich die Sensorkinase DegS deletiert wurde. Weiterhin wurden die Stämme in Sporulationsmedium kultiviert und ein Vergleich zwischen Medium mit IPTG und ohne IPTG Zugabe angestellt. Dabei wurden 118 Gene durch DegU positiv reguliert (241). Die zweite Studie nutze den undomestizierten Wildtyp und eine *degU* Deletion in dem Wildtypstamm und analysierte das Transkriptom in der exponentiellen Phase und in der stationären Phase. Das Wachstum fand in 2 x SG Medium statt (moderates Vollmedium). Durch den Vergleich der beiden Stämme wurden 97 Gene identifiziert, die durch DegU positiv reguliert werden. Jedoch kann keine Unterscheidung zwischen der phosphorylierten und unphosphorylierten DegU Form getroffen werden (167). Die letzte Studie nutze den Wildtyp und die DegU-Hypermutable, welche in LB kultiviert wurden. Das DegU-Regulon wurde in der exponentiellen Phase und in der stationären Phase durch Vergleich der Transkriptomdaten des Wildtyps

mit der DegU-Hypermutable definiert. Insgesamt besteht in diesem Fall das DegU~P Regulon aus 56 Genen (197). Bei der letzten Transkriptomstudie ist zu beachten, dass die DegU-Hypermutable genutzt wurde, die wie bereits erwähnt einen Einfluss auf die Interaktion mit Zielpromotoren hat (218). In allen drei Transkriptomstudien wurde Vollmedium genutzt, sodass noch Nebeneffekte auftreten können, zum Beispiel durch Sporulationsprozesse oder durch die Präsenz von kompatiblen Soluten (86, 154). Des Weiteren wurden in der ersten Studie von Ogura nur DegU regulierte Gene identifiziert, in der von Kobayashi durch beide DegU Formen regulierte Gene und in der Studie von Mäder werden vermutlich auf Grund der DegU-Hypermutable nur DegU~P regulierte Gene abgedeckt. Bei allen Transkriptomstudien wurden die DegU Mutanten mit dem Wildtyp verglichen. Keine Studie nutzte den *degSU* Deletionsstamm. Es konnte aber für ein anderes System in *E. coli* gezeigt werden, dass die Hyperphosphorylierung eines Antwortregulators zu artifiziellen Ergebnissen führt. So hat eine OmpR Hypermutable, aus dem EnvZ-OmpR TCS in *E. coli* einen Einfluss auf den Maltose Metabolismus, welcher unter physiologischen Bedingungen nicht durch das TCS reguliert wird (31, 328). Auf Grund dessen wird der geplante Microarray mit der DegS-Hypermutable in Minimalmedium durchgeführt und als Kontrolle wird der *degSU* Deletionsstamm mitgeführt. Eine weitere Kontrolle wird durch den Stamm mit der nicht mehr phosphorylierbaren DegU Version (*degU146*) hinzugenommen. Durch die Nutzung dieses Stammes kann zwischen DegU und DegU~P regulierten Genen unterschieden werden.

(iv) Das DegU~P Regulon verändert sich unter hyperosmotischen Bedingungen, wie in dieser Studie eindeutig gezeigt werden konnte (Abb. 21 und Abb. 22). Weiterhin konnte das *yqiHIK* Operon bisher nicht dem DegU-Regulon zugeordnet werden. Deshalb wird das DegU-Regulon auch unter hyperosmotischen Bedingungen analysiert, um auch Gene zu identifizieren die durch beide Bedingungen beeinflusst werden.

Für die Array Studie wurden neben den Proben für die RNA Isolierung weitere Vorexperimente durchgeführt. Zum einen wurde eine Wachstumskurve in Helmann Minimalmedium angefertigt (Abb. 58), um das Wachstum der bisherigen drei Stämme (Wildtyp 168, $\Delta degSU$ und DegS-Hypermutable) zu beurteilen. Auch wuchsen die Hypermutablen ein wenig besser als der Wildtyp und die Deletionsmutante, jedoch war der Unterschied nicht so enorm wie in SMM. Weiterhin fiel auf, dass die ODs im Allgemein viel geringer waren, als in SMM kultivierte Stämme (HMM maximale OD₅₇₈ 2,5; SMM maximale OD₅₇₈ 7). Parallel zu der Probenernte für die RNA Isolierung wurden aus denselben Kulturen Proben gezogen, um den intrazellulären Prolingehalt zu bestimmen. Auf Grund dessen konnte gezeigt werden, dass in der Tat eine Salzinduktion und damit eine Adaptation an Salzstress stattfand, da alle Stämme in hyperosmotischen Medium mehr Prolin akkumulierten als unter isoosmotischen Bedingungen. Letztendlich fiel auf, dass der Prolingehalt je nach OD₅₇₈ Schwankungen aufwies, deshalb wurde die Promotoraktivität des *proHJ* Operons bestimmt. Dabei zeigten sich keine Auswirkungen, bei welcher OD die Kulturen geerntet wurden. Dieses Phänomen konnte auch vorher für die Prolinakkumulation in SMM beobachtet werden (persönliche Kommunikation mit Adrienne Zaprasis).

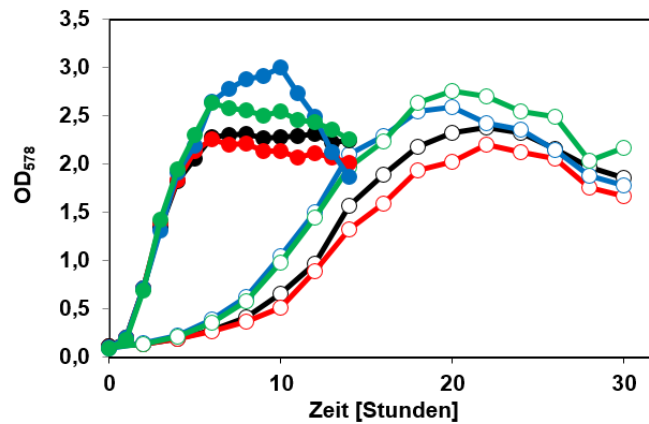


Abb. 58: Einfluss des DegS-DegU TCS auf das Wachstum von *B. subtilis* in Helmann Minimalmedium

Die Stämme Wildtyp 168 (schwarz), SLB40 ($\Delta degSU$, rot), SLB49 [$degU32(Hy)$, blau] und SLB169 [$degS200(Hy)$, grün] wurden in HMM mit (leere Kreise) und ohne (gefüllte Kreise) die Zugabe von 1,2M NaCl kultiviert und das Wachstum photometrisch jede Stunde gemessen. Die Wachstumskurve wurde zweimal mit zwei biologischen reproduziert, dabei ist hier eine der beiden Wachstumskurven abgebildet.

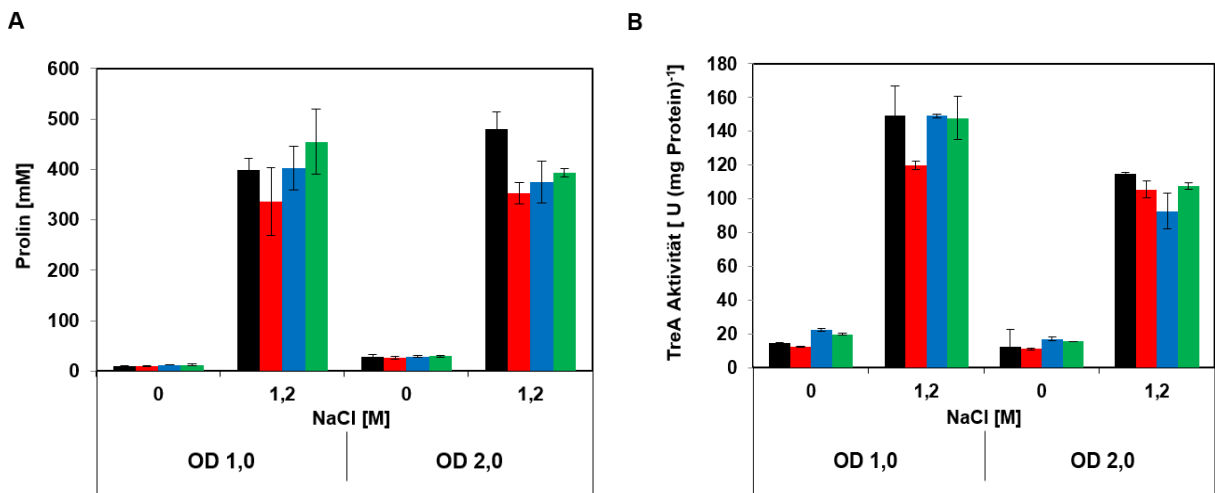


Abb. 59: Einfluss der OD_{578} auf die Prolinkonzentration und die *proH-treA* Promotoraktivität

(A) Bestimmung der intrazellulären Prolin Konzentration und der TreA-Aktivität (B) der *proH-treA* Fusion der Stämme SLB253 (Wildtyp, schwarz), SLB254 ($\Delta degSU$, rot), SLB255 [$degU32(Hy)$] und SLB255 [$degS200(Hy)$]. Die Stämme wurden in HMM \pm 1,2 M NaCl kultiviert wurden. Sowohl bei einer OD von 1 und von 2 wurden Proben für den Bates-Test und für den TreA-Enzymassay gezogen. Die Bestimmung der Prolinkonzentration und der TreA-Aktivität erfolgt aus zwei biologischen Parallelen mit jeweils zwei technischen Parallelen.

IX Danksagung

Natürlich Danke ich zu allererst **Herr Bremer**. Zum einen möchte ich ihnen danken, dass sie es ermöglicht haben, dass ich meine Doktorarbeit bei ihnen machen konnte. Die vielen Diskussionen und Ratschläge zu dem facettenreichen Thema, aber auch die Worte zu allgemeinen Themen waren sehr hilfreich. Vielen Dank für die Begutachtung dieser Arbeit, auf das die pinken Dämpfe verfliegen sind.

An zweiter Stelle gilt mein Dank **Prof. Dr. Thanbichler**, der nicht nur das Zweitgutachten für diese Promotion übernommen hat, sondern auch während meiner TAC Meetings gute Ideen zu meinem Thema beigesteuert hat. In diesem Zusammenhang danke ich auch der **IMPRS** für die Förderung mit Reisegeldern und durch die ich meine „Soft-Skills“ verbessern konnte. **Prof. Dr. Bölker** und **Prof. Dr. Maisner** danke ich für ihre Beteiligung an meinen IMPRS TAC Meetings/ Dissertations-Kommission und den daraus resultierenden Vorschlägen und Diskussionen zu meiner Arbeit.

I want to thank **Cinzia Calvio** and **Nicola Stanley-Wall** for providing me strains, which were a great support for my experiments. Des Weiteren danke ich den „**Greifswäldern**“ (Uwe Völker, Ulrike Mäder und Hermann Rath) für ihre Zusammenarbeit bei den künftigen Microarray Analysen.

Tamara möchte ich für ihre Unterstützung in den letzten drei Jahren danke. Nicht nur im Laboralltag wusstest du eine Antwort und hattest Korrekturvorschläge, sondern auch bei private Fragen konntest du immer mit einem guten Rat helfen. Vielen Dank dafür.

Ein ganz großes Dankeschön geht an **Annina**, du hast mich die letzten 3 Jahre in jeder Hinsicht unterstützt und ein noch größeres Dankeschön für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Vielen, vielen Dank ☺

Ein Dank gilt auch **Patricia**, ohne dich wären Reisen und jegliche anderen Angelegenheiten nicht möglich gewesen. Natürlich auch ein Dankeschön an **Nelli**, die die Nachfolge von Patricia gut gemeistert hat.

Allen Bremerlingen aus Labor 4 gilt ein großes Dankeschön für die tolle Arbeitsatmosphäre. **Jutta**, immer wenn du Urlaub hattest war es in Labor 4 sehr ruhig und das nicht im positiven Sinn. Du hast den Laboralltag aufgepeppt und mir sehr geholfen. Vielen Dank für die Unterstützung bei allen großen und kleinen Problemen, die in den letzten Jahren entstanden waren. Auch möchte ich **Daniela** für die großartige Unterstützung in der heißen Phase meiner Doktorarbeit danken.

Maritha danke ich für ihr technisches Know-How und ihre Hilfe bei meinen unzähligen TreA-Assays. **Jochen** und **Marco** danke ich für ihre unglaubliche Hilfe, wenn ich mit meinem Computer mal wieder kurz vor dem Durchdrehen war.

Natürlich danke ich auch allen anderen Doktoranden (**Adi, Basti, Steffi, Nils, Dani, Laura C und Laura T**) und den Bachelor- und Masterstudenten (**Johanna, Ina, Flo, Marietta, Lukas, Ole und Ludmilla**). Mit euch hat der Laboralltag viel Spaß gemacht. Ich möchte auch **Kathleen** und **Teodora** für die Vorarbeit zu diesem Thema danken. Ins besondere möchte ich meiner Masterstudentin **Bianca** danken. Danke für die tolle Erfahrung deine Betreuerin gewesen zu sein. Es war super eine so selbstständige Studentin betreuen zu können.

Ich möchte auch allen anderen Mitarbeitern der Mikrobiologie danken, durch euch wurde der Laboralltag angenehmer!

Letztendlich möchte ich meiner **Familie** und dem großartigsten **Freund** danken. Ohne die Unterstützung meiner Familie wäre mein Studium und diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Ich kann meinen Dank gar nicht in Worte fassen. Daniel, ohne dich hätte ich die Laborarbeit nicht überlebt. Du hast mich an den Wochenenden so oft besucht und ins Labor begleitet, dass ist unbezahlbar. Vielen, vielen Dank für deine lieben, tollen Worte, die mich immer wieder aufbauen konnten. Euch widme ich meine Doktorarbeit!!!

X Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Das DegS-DegU Zwei-Komponenten System und dessen Rolle bei der Regulation des osmotisch induzierbaren *yqiHIK* Operons aus *Bacillus subtilis*“

selbständig verfasst und keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche Textstellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen wurden, sind mit einer Quellenangabe kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Stephanie Löbach

Ort, Datum

XI Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stephanie Löbach
Geburtsdatum: 01.08.1988
Geburtsort: Kassel
Nationalität: Deutsch
Familienstand: Ledig
E-Mail: stephanieloebach88@gmail.com

Universitätsausbildung

Promotion am Fachbereich Biologie (Mikrobiologie)
[Assoziierter Mitglied der Max-Planck-Gesellschaft/ International Max Planck Research School for Environmental and Cellular Microbiology (IMPRS)]
Thema der Dissertation: Das DegS-DegU Zwei-Komponenten Systems und dessen Rolle bei der Regulation des osmotisch induzierbaren *yqiHIK* Operons aus *Bacillus subtilis*
Betreuer: Prof. Dr. Erhard Bremer

Seit 10/2012

Master Studiengang: Molecular and cellular biology
Philipps-Universität Marburg
Abschluss: Master of Science (Abschlussnote 1,4)
Thema der Masterarbeit: Analysis of the type VI secretion system in *Myxococcus xanthus*
Betreuerin: Prof. Dr. Lotte Søgaard Andersen
Fachmodule: Molekulare Mikrobiologie; Mikrobielle Ökologie; Zellbiologie

10/2010-09/2012

Bachelor Studiengang: Biologie
Philipps-Universität Marburg
Abschluss: Bachelor of Science (Abschlussnote: 2.3)
Thema der Bachelorarbeit: Untersuchung zur Sekretion der Protease PopC aus *M. xanthus*
Betreuerin: Lotte Søgaard Andersen
Vertiefungsmodul: Mikrobiologie II
Fachmodule: Biologie der Zelle, Mikrobiologie I, Genetik I, Tiere, Interaktionen und Lebensgemeinschaften

10/2007-05/2010

Schulausbildung

Gymnasium Bundespräsidenten Theodor-Heuss-Schule
(in Homberg/Efze)
Abschluss: Abitur
Leistungskurse: Mathe, Biologie

09/1988 – 06/2007

Grundschule Osterbach (in Homberg/Efze)

08/1994 – 07/1988

Praktische Erfahrung

10/2012 – 10/2015
Anfertigung der Dissertation im Laboratorium für Mikrobiologie (Prof. Dr. Erhard Bremer) an der Philipps-Universität Marburg

10/2011 – 09/2012
Anfertigung der Masterarbeit im Laboratorium für Mikrobiologie (Prof. Dr. Lotte Søgaard Andersen) am Max-Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie

08/2011 – 09/2011
Praktikum bei Solupharm Pharmazeutische Erzeugnisse GmbH (Melsungen) Abteilung Mikrobiologie

07/2010 – 08/2010
Praktikum bei Solupharm Pharmazeutische Erzeugnisse GmbH (Melsungen) Abteilung Mikrobiologie

10/2009 – 05/2010
Anfertigung der Bachelorarbeit im Laboratorium für Mikrobiologie (Prof. Dr. Lotte Søgaard Andersen) am Max-Planck Institut für terrestrische

07/2009 – 09/2009 Mikrobiologie
 Berufspraktikum bei CSL Behring (Marburg)
 Abteilung Qualitätskontrolle

Besondere Kenntnisse und Fähigkeiten

Fremdsprachen

Englisch Fließend in Wort und Schrift
 Französisch Grundkenntnisse

EDV Kenntnisse Fundierte Kenntnisse in MS- Office (Word, Excel, PowerPoint)

März 2013 Advanced Techniques in Molecular Biology (Higgs / Albers);

Mai 2013 Transcriptomics (Zuccaro);

Juni 2013 Analysis of DNA-Protein Interactions (Bölker);

April 2014 Business-Talk für Mentees (Mentorinnen Netzwerk);

April 2014 Personal Branding – die Marke „ich“ nicht nur im Netz (Mentorinnennetzwerk)

November 2015 GMP Workshop (MARA)

Dezember 2015 Achtsames führen (MARA)

Betreuung von Bachelor of Science Praktika

Kernmodul 1 (Genetik und Mikrobiologie) mit 45 Stunden

Vertiefungsmodul (Mikrobiologie) Kursleitung mit 6 Wochen

Teilnahme an Programmen/ Konferenzen

Seit 2013 VAAM (Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie) Mitglied

Seit 2013 Mitglied des Mentorinnen-Netzwerkes

Dezember 2012 Osmomeeting Osnabrück

April 2013 Von biologischer Diversität zu mikrobiellen Zellfabriken (Synmikro)

April 2014 BaCell meeting Bratislava

März 2014 Marburg Meeting on Microbiology (SFB meeting)

Mai 2014 Microbial Formation of Biofuels and Platform Chemicals (Synmikro)

März 2015 VAAM Meeting in Marburg (Poster Präsentation)

April 2015 BaCell meeting Amsterdam (Mündlicher Vortrag)

Juni 2015 8th International Conference on Gram-positive Microorganisms; Montecatini, Italien
 (Poster Präsentation)

Publikationen:

Konovalova A, Löbach S, Søgaaard-Andersen L. (2012): A RelA-dependent two-tiered regulated proteolysis cascade controls synthesis of a contact-dependent intercellular signal in *Myxococcus xanthus*.

Mol Microbiol; 84(2):260-75

Chang YW, Chen S, Tocheva EI, Treuner-Lange A, Löbach S, Søgaaard-Andersen L, Jensen GJ.(2014) Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography.

Nat Methods; 11(7):737-9